

UNTERSUCHUNGEN ZUR
QUANTITATIVEN BESTIMMUNG VON
CATECHOLAMINEN IN BLUT UND URIN
MIT VERSCHIEDENEN CHROMATO-
GRAPHISCHEN ARBEITSTECHNIKEN

Den Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

zur

Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt von
Klaus Goßler
aus Forchheim

1980

1981 181

UNTERSUCHUNGEN ZUR
QUANTITATIVEN BESTIMMUNG VON
CATECHOLAMINEN IN BLUT UND URIN
MIT VERSCHIEDENEN CHROMATO-
GRAPHISCHEN ARBEITSTECHNIKEN

Den Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg

zur
Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt von
Klaus Gößler
aus Forchheim

Als Dissertation genehmigt von den Natur-
wissenschaftlichen Fakultäten der Universität
Erlangen-Nürnberg



Tag der mündlichen Prüfung: 18.12.1980

Vorsitzender der
Promotionskommission: Prof. Dr. K. Brodersen

1. Berichterstatter:
 Universitätsprofessor Dr. G. Hesse
2. Berichterstatter:
 Universitätsprofessor Dr. K. Geibel

Die experimentellen Arbeiten wurden
im Institut für Arbeits- und Sozial-
medizin und Poliklinik für Berufs-
krankheiten der Universität Erlangen-
Nürnberg (Direktor: Prof. Dr.med. H.
Valentin) ausgeführt.

Meinen Eltern und Großeltern in
Dankbarkeit gewidmet

Meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. G. Hesse, danke ich herzlich für das stets große Interesse und die Aufgeschlossenheit für alle Fragestellungen bezüglich der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Professor Dr. H. Valentin gilt mein ganz besonderer Dank für die Möglichkeiten, die er mir bei der Ausführung der Arbeiten in seinem Institut geboten hat.

Herzlich danken möchte ich ihm außerdem für seine Hilfe bei der Lösung biomedizinischer Problemstellungen.

Der Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Unfallschutz - Dortmund - bin ich für die großzügig gewährte finanzielle Unterstützung zu großem Dank verpflichtet.

Meinen Freunden, Kollegen, Mitarbeiterinnen
und Mitarbeitern im Arbeitskreis - insbe-
sondere Herrn Chem. Ing. (grad.) K.H. Schal-
ler - danke ich für die ausgezeichnete
Zusammenarbeit

Inhaltsverzeichnis

	Seite
ZUSAMMENFASSUNG	1
1. EINLEITUNG	6
2. HAUPTTEIL	19
2.1 Die gaschromatographische Bestimmung der Catecholamine	
2.1.1 Einleitung	
2.1.2 Prinzip der Verfahren	22
2.1.3 Geräte, Chemikalien	
2.1.4 Präparative Vorversuche zur Derivatbildung von Adrenalin und Noradrenalin mit Trifluoressigsäureanhydrid	
2.1.5 Gaschromatographische Untersuchungen	35
2.1.5.1 Derivatisierung der Catecholamine mit Trifluoressigsäureanhydrid	
2.1.5.2 Derivatisierung der Catecholamine mit Monochlordifluoressigsäureanhydrid	37
2.1.5.3 Derivatisierung der Catecholamine mit Pentafluorpropionsäureanhydrid	40
2.1.5.4 Derivatisierung der Catecholamine mit Heptafluorbuttersäureanhydrid	
2.1.6 Diskussion	43

2.2	Die spektralfluorimetrische Bestimmung der Catecholamine in Urin und Plasma	49
2.2.1	Einleitung	
2.2.2	Prinzip der Verfahren	55
2.2.3	Versuchsbeschreibungen	57
2.2.3.1	Geräte und Chemikalien	
2.2.3.2	Probenlagerung	
2.2.3.3.	Versuche zur fluorimetrischen Endpunktsbestimmung	
2.2.3.3.1	Oxidation mit Jod	
2.2.3.3.2	Oxidation mit Kaliumhexacyanoferrat (III)	64
2.2.3.4	Versuche zur Probenvorbereitung	
	Abtrennung der Catecholamine aus dem Urin	65
2.2.3.4.1	Adsorption der Catecholamine an Kationenaustauscher	
2.2.3.4.2	Adsorption der Catecholamine an Aluminiumoxid	69
2.2.3.5	Erstellung von Catecholamin-Additionskurven auf Urinbasis	70
2.2.3.5.1	Urin-Catecholaminanalysen über Ionenaustauschromatographie	
2.2.3.5.2	Urin-Catecholaminanalysen über Adsorptionschromatographie an Aluminiumoxid	75
2.2.3.6	Analytische Zuverlässigkeitskriterien der Verfahren	

	Seite
2.2.4	Diskussion 79
2.3	Der radiochemische Nachweis der Plasma- Catecholamine 81
2.3.1	Einleitung
2.3.2	Prinzip der Verfahren 86
2.3.3	Die analytische Bestimmung der Gesamt-Catecholamine im Plasma (VALENTIN et al. 1977) 90
2.3.3.1	Geräte, Chemikalien und Lösungen
2.3.3.2	Probennahme und Proben- lagerung
2.3.3.3	Arbeitsvorschrift
2.3.3.4	Eichung
2.3.3.5	Analytische Zuverlässig- keitskriterien der Methode 91
2.3.3.6	Untersuchungen der Catechol-O-Methyl- transferase-Präparation 93
2.3.3.7	Untersuchungen zu den einzelnen Arbeits- schritten des Analysen- ganges 100
2.3.4	Die fraktionierte quanti- tative Bestimmung von Adrenalin und Noradre- nalin 104
2.3.4.1	Geräte, Chemikalien und Lösungen
2.3.4.2	Probennahme und Proben- lagerung
2.3.4.3	Arbeitsvorschrift
2.3.4.4	Eichung

	Seite
2.3.4.5 Analytische Zuverlässigkeitskriterien der Methode	107
2.3.5 Die Bestimmung der Gesamtcatecholamine im Plasma nach COYLE u. HENRY (1973)	110
2.3.5.1 Geräte, Chemikalien und Lösungen	
2.3.5.2 Probennahme und Probenlagerung	
2.3.5.3 Arbeitsvorschrift	
2.3.5.4 Eichung	
2.3.5.5 Analytische Zuverlässigkeitskriterien der Methode	113
2.3.6 Die quantitative Bestimmung von Noradrenalin im Plasma	
2.3.6.1 Geräte, Chemikalien und Lösungen	
2.3.6.2 Probennahme und Probenlagerung	
2.3.6.3 Arbeitsvorschrift	114
2.3.6.4 Erstellung von Eichkurven	
2.3.6.5 Analytische Zuverlässigkeitskriterien der Methode	
2.3.6.6 Berechnung des Analysenergebnisses mit dem Doppelisotopenverdünnungsverfahren	116
2.3.7 Diskussion	117
2.4 Der Nachweis der Catecholamine und einiger ihrer Metaboliten im Urin mit der Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie	157

	Seite
2.4.1	Einleitung 157
2.4.2	Prinzip der Verfahren 160
2.4.3	Die quantitative Bestimmung von Vanillinmandelsäure, Homovanillinsäure und Vanillinsäure im Urin 162
2.4.3.1	Geräte und Chemikalien
2.4.3.2	Probenlagerung
2.4.3.3	Arbeitsvorschrift
2.4.3.4	Eichung 163
2.4.3.5	Analytische Zuverlässigkeitskriterien der Methode
2.4.4	Die quantitative Bestimmung von Noradrenalin, Adrenalin, Dopamin und Dopa im Urin 166
2.4.4.1	Geräte und Chemikalien
2.4.4.2	Probenlagerung
2.4.4.3	Arbeitsvorschrift
2.4.4.4	Eichung
2.4.4.5	Analytische Zuverlässigkeitskriterien der Methode 170
2.4.5	Diskussion
2.4.5.1	Bestimmung der Catecholaminmetaboliten im Urin
2.4.5.2	Bestimmung der Catecholamine im Urin 183
3.	SCHLUSSFOLGERUNGEN 194
4.	Einsatz der Methoden in der Arbeitsmedizin anhand einiger Beispiele 201

5.	EXPERIMENTELLER TEIL	205
5.1	Versuchsbeschreibungen zur gaschromatographischen Bestimmung der Catechol- amine	
5.1.1	Geräte, Chemikalien	
5.1.2	Methode für die Her- stellung des Adrenalin- Derivates	206
5.1.3	Methode für die Her- stellung des Noradrena- lin-Derivates	207
5.1.4	Derivatisierung der Catecholamine mit Tri- fluoressigsäureanhydrid	
5.1.5	Gaschromatographische Be- dingungen für die Trennung der Trifluoressigsäureanhy- drid-Derivate mit der stationären Phase OV 17	208
5.1.6	Gaschromatographische Be- dingungen für die Trennung der Trifluoressig- säureanhydrid-Derivate mit der stationären Phase QF 1	209
5.1.7	Gaschromatographische Be- dingungen für die Trennung der Monochlordifluoressig- säureanhydrid-Derivate mit der stationären Phase OV 17	210
5.1.8	Gaschromatographische Be- dingungen für die Trennung der Pentafluorpropion- säureanhydrid-Derivate mit der stationären Phase XF 1105	211

5.2	Versuchsbeschreibungen zur spektralfluorimetrischen Bestimmung der Catecholamine in Urin und Plasma	212
5.2.1	Probenlagerung	
5.2.2	Geräte und Chemikalien	
5.2.3	Arbeitsvorschrift für die Oxidation mit Kaliumhexacyanoferrat (III)	213
5.2.4	Konditionierungsmethoden für die Kationenaustauscherharze	214
5.2.5	Analysengang zur Bestimmung der Adsorptionsraten verschiedener Kationenaustauscher	216
5.2.6	Analysengang zur Bestimmung der Adsorptionsraten verschiedener Aluminiumoxide	217
5.2.7	Arbeitsvorschrift für die Urin-Catecholaminanalyse über Adsorptionschromatographie an Aluminiumoxid	218
5.3	Versuchsbeschreibungen zur radiochemischen Bestimmung der Catecholamine	219
5.3.1	Die analytische Bestimmung der Gesamt-Catecholamine im Plasma (VALENTIN et al.1977)	
5.3.1.1	Geräte, Chemikalien und Lösungen	
5.3.1.2	Probennahme und Probenlagerung	224
5.3.1.3	Arbeitsvorschrift	225
5.3.1.4	Chromatographiebedingungen für die säulenchromatographische Isolierung der COMT	228

5.3.1.5	Präparative Darstellung von 3-H-Metanephrin bzw. 3-H-Normetanephrin	228
5.3.2	Die fraktionierte quanti- tative Bestimmung von Adrenalin und Noradrenalin	229
5.3.2.1	Geräte, Chemikalien und Lösungen	230
5.3.2.2	Probennahme und Proben- lagerung	231
5.3.2.3	Arbeitsvorschrift	
5.3.3	Die Bestimmung der Gesamt- Catecholamine im Plasma nach COYLE u. HENRY (1973)	233
5.3.3.1	Geräte, Chemikalien und Lösungen	
5.3.3.2	Probennahme und Proben- lagerung	234
5.3.3.3	Arbeitsvorschrift	
5.3.4	Die quantitative Bestimmung von Noradrenalin im Plasma	235
5.3.4.1	Geräte, Chemikalien und Lösungen	236
5.3.4.2	Probennahme und Proben- lagerung	239
5.3.4.3	Arbeitsvorschrift	240
5.3.4.4	Erstellung von Eichkurven	242
5.3.5	Herstellung der Sprüh- reagenzien für Dünnschicht- platten	243
5.4	Versuchsbeschreibungen zur hochdruckflüssigkeitschromato- graphischen Bestimmung von Catecholaminen und einiger ihrer Metaboliten im Urin	244

5.4.1	Die quantitative Bestimmung von Vanillinmandelsäure, Homovanillinsäure und Vanillinsäure im Urin	244
5.4.1.1	Geräte und Chemikalien	
5.4.1.2	Probenlagerung	245
5.4.1.3	Arbeitsvorschrift	
5.4.1.4	Eichung	247
5.4.2	Die quantitative Be- stimmung von Noradrenalin, Adrenalin, Dopamin und Dopa im Urin	247
5.4.2.1	Geräte und Chemikalien	
5.4.2.2	Probenlagerung	248
5.4.2.3	Arbeitsvorschrift	
5.4.2.4	Eichung	250
6.	LITERATUR	251

ZUSAMMENFASSUNG

Die Catecholamine Adrenalin, Noradrenalin, Dopamin und Dopa und ihre Metaboliten Vanillinmandelsäure, Homovanillinsäure und Vanillinsäure sind endogene Substanzen des menschlichen Körpers und kommen im Blut und Urin vor. Die Catecholamin-Konzentrationen bewegen sich normalerweise im Blutplasma bzw. Urin im Picogramm-respektive Nanogramm-Bereich (Plasma-Ruhewert: Adrenalin ca. 50 pg/ml, Noradrenalin ca. 250 pg/ml. Urin-Normalwerte: Adrenalin ca. 10 - 15 ng/ml, Noradrenalin ca. 30 - 35 ng/ml).

Die Catecholamine sind aus medizinischer Sicht im Zusammenhang mit verschiedenen Erkrankungen von Interesse. In der Arbeitsmedizin werden die Catecholaminspiegel im Plasma und die Ausscheidung im Urin zur Objektivierung und Quantifizierung von physischen und psychischen Belastungen herangezogen. Im Rahmen eines Forschungsprojektes "Objektivierung und Quantifizierung des Stress im Berufsleben auf biochemischer Basis" konnte gezeigt werden, daß die Catecholamin-Konzentrationen im Plasma und die Ausscheidungen dieser Substanzen im Urin in vielen Fällen gute Korrelate zu physischen und psychischen Belastungen ergeben. Die Catecholamin-

Metaboliten dahingegen erbrachten keine signifikanten Ergebnisse. Das Noradrenalin spiegelte vor allem physische, das Adrenalin psychische Vorgänge wieder. Kurzzeitige Belastungsperioden ergaben schnelle Zu- und Abnahmen der Konzentrationen im Blut. Längerfristige Vorgänge resultierten in Änderungen der Catecholaminspiegel im Urin.

Zur Bearbeitung des erwähnten Forschungsvorhabens war es notwendig, zuverlässige Methoden für die quantitative Bestimmung der Catecholamine und ihrer Metaboliten im Plasma und Urin zu erstellen.

Als problematisch bei der Analytik erwiesen sich die niedrigen Konzentrationen der Substanzen und ihre chemische Instabilität. Für die Erstellung der Analysenverfahren verwendeten wir die Gaschromatographie, die Spektralfluorimetrie, die Radiochemie und die Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie.

Die gaschromatographische Bestimmung der Catecholamine beinhaltete eine Derivatisierung mit perhalogenierten Säureanhydriden. Hierbei entstanden verdampfbare Verbindungen, welche sich gaschromatographisch auftrennen und am Elektroneneinfangdetektor nachweisen ließen.

Die Gaschromatographie erwies sich als ungeeignete Analysetechnik. Probleme bei der Derivatisierung, schlechte Reproduzierbarkeit und ungenügende Nachweisgrenzen ließen unsere Versuche nicht über die Analyse wässriger Standardlösungen hinauskommen. Eine Übertragung auf biologisches Material war unmöglich.

Bei den spektralfluorimetrischen Nachweismethoden, welche vor allem in der Urinanalytik eingesetzt werden, wurden die Catecholamine zunächst säulenchromatographisch über Ionenaustauscher aus dem Harn isoliert. Dann erfolgte eine Oxidation der Substanzen zu fluoreszierenden Verbindungen. Eine Unterscheidung zwischen Adrenalin und Noradrenalin nahmen wir durch unterschiedliche Reaktionsbedingungen vor. Die Spektralfluorimetrie konnte zu einem zuverlässigen und praktikablen Verfahren für die Bestimmung der Urin-Catecholamine ausgebaut werden. Als nachteilig erwies sich bei Parallelversuchen mit chromatographischen Verfahren die mangelnde Spezifität bezüglich Störsubstanzen und Matrixeffekten. Eine Übertragung spektralfluorimetrischer Küvettenverfahren auf die Catecholamin-Plasmaanalyse scheiterte an den Nachweisgrenzen.

Die radiochemischen Verfahren - insbesondere zur Plasma-Analytik der Catecholamine eingesetzt - basierten prinzipiell auf Radioreagenzmethoden. Die Catecholamine wurden hierbei unter enzymatischer Katalyse durch die Catechol-Sauerstoff-Methyltransferase mit tritiummarkiertem S-Adenosyl-L-Methionin als Substrat durch Übertragung einer CT_3 -Gruppe in die entsprechenden Metanephrene übergeführt. Nach mehreren Aufarbeitungsschritten erfolgte die Quantifizierung im Flüssigkeits-szintillationszähler. Ein weiteres Verfahren, welches lediglich zur Bestimmung des Noradrenalins im Plasma benutzt werden konnte, führte die beschriebene Methylierungsreaktion durch katalytische Mitwirkung des Enzyms Phenylethanol-N-Methyltransferase durch, wobei markiertes Adrenalin entstand. Dieses wurde dann ebenfalls im Szintillationszähler gemessen. Die radiochemischen Untersuchungen ergaben zwei zuverlässige Methoden für die quantitative Bestimmung der Gesamt-Catecholamine im Plasma. Die Systeme konnten nur teilweise auf die differentielle Analyse von Adrenalin und Noradrenalin übertragen werden. Neben den Gesamt-Catecholaminmethoden haben wir ein Verfahren für die quantitative Bestimmung des Plasma-Noradrenalins entwickelt. Die Radiochemie besaß die besten Nachweisgrenzen für die Catecholamine.

Die HPLC-Methoden zur Bestimmung der Catecholamine im Urin beruhten im Prinzip auf der Detektion

der sog. "nativen Fluoreszenz" der Catecholamine. Die Messungen erfolgten hierbei in den jeweiligen Anregungs- und Emissionsmaxima. Die Probenaufarbeitung wurde im Batch-Verfahren durch Adsorption an Aluminiumoxid ausgeführt. Die Bestimmung der Catecholamin-Metaboliten im Urin nahmen wir nach Flüssig-Flüssig-Extraktion durch photometrische Messung in den UV-Absorptionsmaxima der Substanzen hochdruck-flüssigkeitschromatographisch vor. Die Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie ließ sich aufgrund ihrer Nachweisgrenzen vor allem für die Analyse der Urin-Catecholamine bzw. deren Metaboliten einsetzen. Diese Analysentechniken zeichneten sich durch hohe Selektivität und Spezifität aus.

Für alle Verfahren wurden umfangreiche Versuche zur Probenaufarbeitung und Endpunktsbestimmung vorgenommen. In einigen Fällen untersuchten wir die einzelnen Analysenschritte. Hierbei wurde besonderer Wert auf die Messung im biologischen Material gelegt.

Für jedes routinereif entwickelte Analysenverfahren ermittelten wir die Daten der analytischen Zuverlässigkeitskriterien wie z.B. Präzision in der Serie, Wiederauffindungsraten, Linearität der Eichung, Nachweisgrenzen und Praktikabilität. Die Ergebnisse genügten in allen Fällen den Ansprüchen, welche an ein Routineverfahren des klinisch-chemischen Laboratoriums gestellt werden.

1. EINLEITUNG

Die Catecholamine sind Derivate des Phenylethylamins. Entsprechend dem Brenzcatechin besitzen sie zwei Hydroxylgruppen am Benzolring. Ihre biologisch wichtigsten Vertreter sind Dopamin (3,4-Dihydroxyphenylethylamin), Noradrenalin (2-Amino-1- (3,4-dihydroxyphenyl)-ethanol und Adrenalin (1- (3,4-Dihydroxyphenyl)-2-methylamino-ethanol (Abb. 1).

Gründliche Kenntnisse über das physikalische und chemische Verhalten der Catecholamine sind von großer Wichtigkeit für das Verständnis der biologischen Wirkungen dieser Substanzen.

Die verschiedenen Catecholamine haben sehr ähnliche chemisch-physikalische Verhaltensweisen. Da sowohl basische Eigenschaften durch die Aminogruppe als auch saure Eigenschaften durch die phenolischen Hydroxylgruppen vorliegen, zeigen die Catecholamine amphoterer Charakter. Sie sind alle in Wasser löslich und nahezu unlöslich in allen organischen Lösemitteln wie z.B. Ethanol, Schwefelkohlenstoff, Chloroform, Petroläther, Benzol und Ether. Gut löslich dagegen sind die Catecholamine im Alkalischen, jedoch nicht in Ammoniak und Alkalicarbonatlösungen. Außerdem gehen die Catecholamine sehr gut im

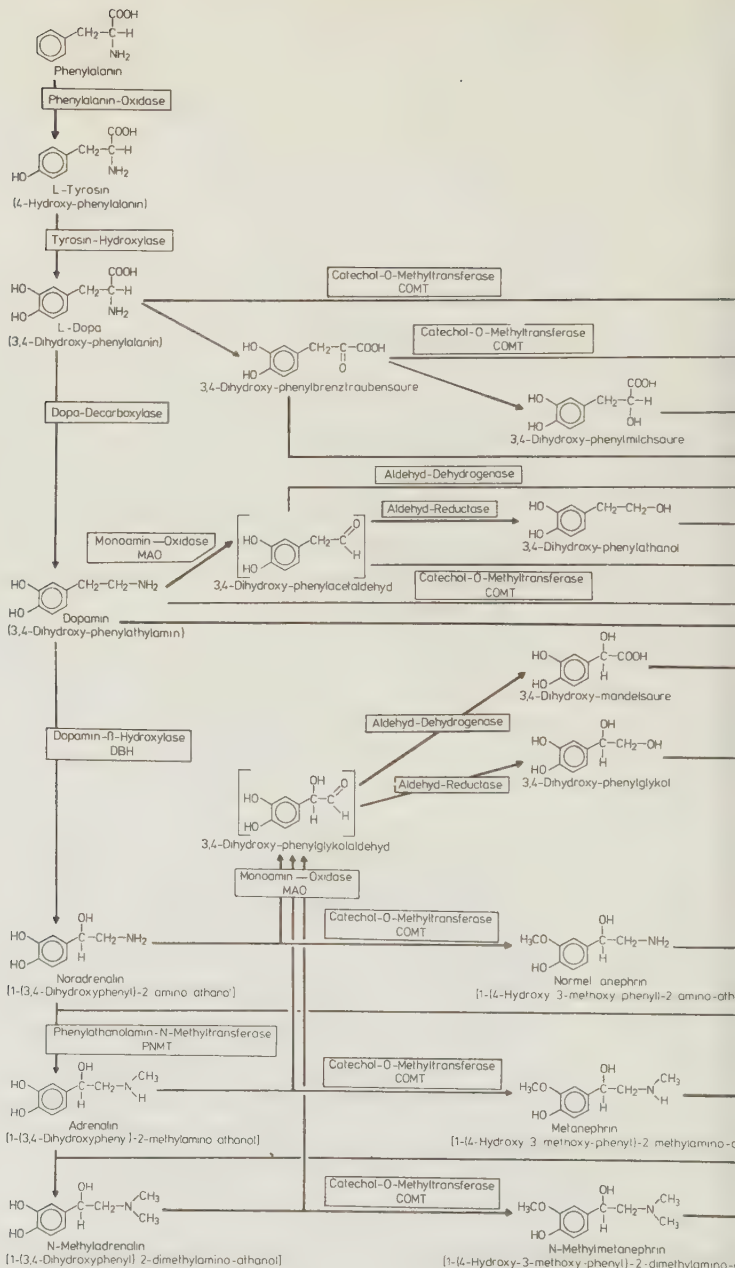
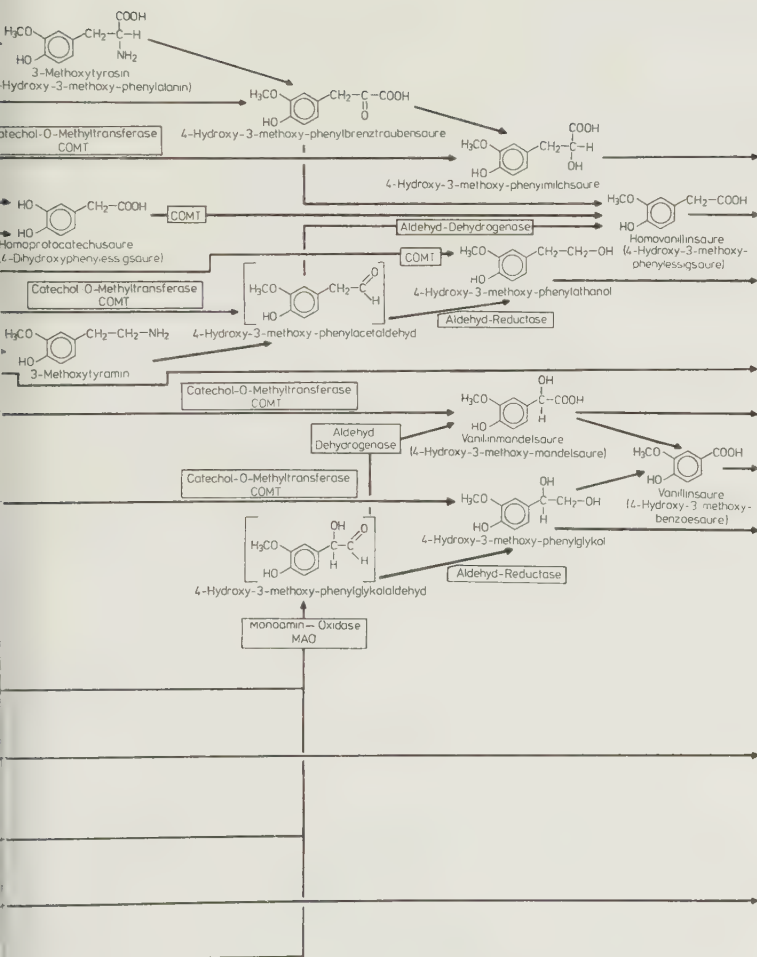


Abbildung 1:
Synthese- und Abbauewege der Catecholamine im menschlichen Körper



Sauren durch Bildung von Ammoniumsalzen in Lösung.

Die drei Säure-Dissoziationskonstanten mit pK_a -Werten von ungefähr 9; 10 und 13 ergeben sich aus der Dissoziation der 2 phenolischen Gruppierungen am aromatischen Ring und aus der Deprotonisierung der Ammoniumgruppe in der Seitenkette. Die Dissoziationskonstante mit pK_a ca. 13 wird von den meisten Autoren der Ionisierung an der para-ständigen Phenolgruppe zugeordnet (GRANOT 1976).

Die hohe chemische Instabilität der Catecholamine kommt zum einen von ihrer Lichtempfindlichkeit, zum anderen von ihrer leichten Oxidierbarkeit. Die Oxidation kann bereits durch den Luftsauerstoff erfolgen. Dieses Verhalten wird vor allem durch die in meta- und para-Stellung stehenden phenolischen Hydroxylgruppen bewirkt. Zum Beispiel oxidieren Adrenalin und Noradrenalin außerordentlich leicht zu Adrenochrom und Noradrenochrom.

In reiner Form vorliegende Catecholamine sind farblose Substanzen. An der Luft färben sich diese jedoch durch Oxidation schnell gelblich. Beim Erhitzen zersetzen sich die Catecholamine, ohne definierte Schmelzpunkte zu besitzen.

Natürlich vorkommende Catecholamine sind linksdrehend, die rechtsdrehenden Formen sind biologisch praktisch inaktiv. Dopamin ist nicht optisch aktiv.

Die physiologischen und biochemischen Forschungen der letzten Jahrzehnte über die Catecholamine bauen auf den tierexperimentellen Erkenntnissen des Nobelpreisträgers Otto LOEWI (1921) auf. Ihm gelang es nach Erregung sympathischer Nerven eine "humorale Übertragung" des Reizes nachzuweisen. Hierbei handelt es sich, wie er dann in den Jahren 1936 und 1937 zeigte, um eine Wirkung des Adrenalins. CANNON und URIDIL (1921/22) konnten nach elektrischer Reizung von sympathischen Nervenfasern einen weiteren Stoff des humoralen Übertragungsmechanismus finden. Dieser wies einige andere Eigenschaften als das Adrenalin auf und wurde später als Noradrenalin identifiziert (HOLTZ u. SCHÜMANN 1948, HOLTZ u. SCHÜMANN 1949). Es folgten zahlreiche Studien zum Stoffwechsel und zur Wirkung der Catecholamine.

Die Catecholamine werden im menschlichen Körper vor allem im zentralen Nervensystem, in den Zellen des sympathischen Nervensystems, im Nebennierenmark und an den sympathischen Nervenendigungen synthetisiert.

Synthese und Abbau der Catecholamine im Säugetierorganismus sind in Abbildung 1 dargestellt.

Ausgangssubstanz ist das Phenylalanin. Aus diesem entsteht durch Hydroxylierung unter Mitwirkung der Phenylalanin-Oxidase das Tyrosin. Durch eine weitere Hydroxylierung am Ring wird dann unter Mitwirkung des Enzyms Tyrosin-Hydroxylase das Dopa gebildet. Die Aktivität dieser Hydroxylase, welche in Gehirn und Nebennierenmark nachgewiesen werden konnte, ist geschwindigkeitsbestimmend für die Synthese der Catecholamine. Durch Rückkoppelung wird die Synthese durch die Konzentration der Endpunkte Adrenalin und Noradrenalin im biologischen Material gesteuert (sog. "Feedback-Mechanismus").

Im folgenden Syntheseschritt wird Dopamin gebildet. Es entsteht durch die enzymatische Decarboxylierung von Dopa. Im Vergleich zur vorangehenden Hydroxylierung verläuft diese Reaktion sehr viel rascher.

Dies gilt ebenso für die Hydroxylierung des Dopamins zum Noradrenalin. Die Hydroxylierung in der beta-Stellung der Seitenkette katalysiert das Enzym Dopamin- β -Hydroxylase.

Die anschließende Methylierung an der primären Aminogruppe, welche vom Noradrenalin zum Adrenalin führt, geschieht durch die Phenylethanolamin-N-Methyl-Transferase.

Die Inaktivierung der Catecholamine erfolgt außerhalb der intrazellulären Speichergranula sehr

rasch (Abb. 1). Der Abbau kann auf zweierlei Weise erfolgen durch:

1. Oxidative Desaminierung und anschließende Methylierung der metaständigen Hydroxylgruppe des aromatischen Ringes.
2. Methylierung der metaständigen Hydroxylgruppe und anschließende oxidative Desaminierung.

Die hier beteiligten Enzyme sind zum einen die Monoaminoxidase (MAO), welche sowohl die Catecholamine selbst als auch ihre metaständig methylierten Derivate abbauen kann. Zum anderen die Catechol-O-Methyltransferase (COMT), die in meta-Stellung stehende Hydroxylgruppen methylieren kann.

Beide Abbauwege führen zu den gleichen Endprodukten. Beim Dopamin sind es die Homovanillinsäure (HVA) und das 4-Hydroxy-3-Methoxyphenylethanol und beim Noradrenalin und Adrenalin die Vanillinmandelsäure (VMA) und das 4-Hydroxy-3-Methoxyphenylglycol.

Wurde zuerst desaminiert, werden folgende Zwischenprodukte gebildet:

3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure und
3,4-Dihydroxyphenylethanol bzw.
3,4-Dihydroxymandelsäure und
3,4-Dihydroxyphenylglycol.

Kommt es zunächst zur Methylierung der meta-ständigen OH-Gruppe, so entstehen als Zwischenprodukte das 3-Methoxytyramin, das Normetanephrin und das Metanephrin.

Die Catecholamine werden vom menschlichen Organismus in freier und in konjugierter Form ausgeschieden. Bei den Konjugaten handelt es sich um Sulfatester oder Glucuronide. Der konjugierte Anteil an der Gesamtausscheidung beträgt beim Adrenalin und Noradrenalin etwa 50%, bei den Metanephrinen 80%, bei den Phenolcarbonsäuren liegt er unter 10%.

Beim gesunden Menschen werden etwa 80 bis 85% der aus dem Catecholaminstoffwechsel stammenden Substanzen in Form von Vanillinmandelsäure, ca. 15% als Metanephrin und Normetanephrin und nur etwa 1 bis 2% als Adrenalin bzw. Noradrenalin ausgeschieden.

Im Blut kommen die Catecholamine in sehr geringen Mengen vor (Adrenalin: ca. 50 pg/ml, Noradrena-

lin: ca. 200 pg/ml). Die Konzentrationen im Harn sind ungefähr um den Faktor 100 höher (Adrenalin: 10 - 15 ng/ml, Noradrenalin: 35 - 40 ng/ml). Zusammenstellungen der von verschiedenen Autoren in den letzten Jahren ermittelten Normalwerte befinden sich in Tabelle 1 und 2.

Die Catecholamine lösen als Hormone und Neurotransmitter im menschlichen Körper ein weites Spektrum von Wirkungen aus. Sie spielen eine Rolle beim chemischen Übertragungsmechanismus des Nervensystems und bei der hormonellen Regelung verschiedener Organe. Bekannt sind Einflüsse auf Herz und Kreislauf, das zentrale Nervensystem, die Bronchien, den Stoffwechsel und die Verdauung.

Die quantitative Bestimmung der Catecholamine und ihrer Metaboliten in Blut und Urin hat in der Medizin deshalb eine mannigfaltige Bedeutung.

Erhöhte Catecholaminspiegel finden sich z.B. bei tumorartigen Erkrankungen der Nebenniere, dem Phäochromocytom und dem Neuroblastom. Weiterhin werden Zusammenhänge zwischen den Catecholaminen und Erkrankungen wie Herzinfarkt, dem Asthma bronchiale, der chronischen Hepatopathie, der Hyperthyreose, der Niereninsuffizienz und dem Carcinoidsyndrom diskutiert.

node	Author	Substanz- untersuchte Flüssigkeit	A - P pg/ml	NA - P pg/ml	DA - P pg/ml	A - U µg/l	NA - U µg/l	DA - U µg/l	U µg/die
bio- nisch	Bühler, Da Prada	1977	64+ 5 (N=11)	203+ 10 (N=11)	98 +20 (N=11)				-
	Cryer, Santiago	1974	43+ 5 (N= 6)	267+ 36 (N= 6)					14
	Videbaek, Christ.	1972	40	210					-
	Christensen	1973			200+60				
	Christensen	1973	50+ 50 (N=16)	220+ 90 (N=16)					
	Engelman, Portnoy	1970	50+ 30 (N=22)	200+ 80 (N=22)					
	Schiele	1978		235 (Median) (N=61)					
	Pedersen, Christ.	1975	45 (N=26)	258 (N=26)		7,0 (N=10)	31,0 (N=10)	22,0 (N=10)	
	Christensen	1972	50 (N= 4)	270 (N= 4)					
	Da Prada, Zürcher	1976	47 + 7 (N= 7)	200+ 23 (N= 7)	127+ 20 (N=7)				
	Johnson	1977	16 +11 (N=30)	165+ 66 (N=30)					
	Weise, Kopin	1976	67+ 9,2 (N=13)	208+ 17 (N=13)	33+ 8 (N=13)				
	Henry	1975		254+ 77 (N= 7)					
	Rawlinson	1978	128,2+ 73,3 (N=18)	490,6+ 101,5 (N=18)					
	Wisser	1979	26-85 (N= 4)	73-215 (N=4)	9-37 (N= 4)				
matomato- hisch	Wong, Ruthven	1973				24,2+ 4 (N=8)	52,1+15 (N=8)	402+86 (N=)	
or-	Schiele	1978				8,1+6,2 (N=45)	45+35 (N=45)		
trisch	Peyrin	1973				20+4 (N=25)	90+21 (N=25)		
	Blau	1977							36,1 (N=)

THODE	AUTOR	SUBSTANZ- UNTERSUCHTE FLÜSSIGKEIT	A - P pg/ml	NA - P pg/ml	Dopamin DA - P	A - U µg/l µg/die	NA - U	DA - U	
nor- adrenalin- metrisch	Wisser	1970				5,8 (N=98)	39 (N=98)	234 (N=98)	1
	De Schaepdryver	1977				11,5 $\pm$ 0,9 (N=17)	56,9 $\pm$ 3,7 (N=17)	254,6 $\pm$ 25,0 (N=20)	15
	Werner	1975				8,2 $\pm$ 3,1 (N=17)	37,9 $\pm$ 11,5 (N=17)		1
	Renzini, Brunori	1970	66 $\pm$ 13 (N=12)	174 $\pm$ 24 (N=12)					
	Griffiths	1970	40 $\pm$ 40 (N=50)						
	O'Hanlon, Campuz.	1970	79 $\pm$ 47 (N=12)	174 $\pm$ 52 (N=12)					
	Kägi, Burger	1957	250 (N=)	2560 (N=)					
	Takahashi	1972				5,5 $\pm$ 1,7 (N=10)	26,2 $\pm$ 8,8 (N=10)	91 $\pm$ 24 (N=10)	

2.1 : Literaturzusammenstellung der Normalwerte in Blut und Urin einiger beim Menschen vorkommender Catecholamine

A - Adrenalin NA - Noradrenalin DA - Dopamin

Methode	Autor	untersuchte Flüssigkeit	µg/d	µg/d	säure mg/d	säure mg/d
ur-	Smith	1962	72, 1 + 5, 7	158, 6 + 17, 5	(N=19)	
etrisch	Kahane	1967	130	(N=15)		
	Kahane	1971			4, 8 (N=7)	4, 2 (N=7)
s-	Bertani	1970	93 + 3	116 + 3	(N=16)	
romato-	Brewster	1977				
aphisch	Dziedzie	1972			0, 4-12, 4 (N=7)	5, 9-21, 1 (N=7)
	Williams	1964			2, 2 (N=8)	3, 3 + 1, 1 (N=30)
						3, 1 (N=8)
unschicht-	Strobach	1966			4, 1	
romato-	Sankoff	1963				8, 23 + 2, 96 (N=10)
aphisch	Wisser	1970			4.6 (N=98)	
piechromato-	Discherl	1963			9, 2 + 3, 3 (N=12)	
aphisch						
ulenchromato-	Messiha	1972			3, 6 + 1, 2 (N=12)	9, 4 + 2, 5 (N=)
aphisch						

bb. 2: Literaturzusammenstellung der Normalwerte einiger beim Menschen vorkommender Catecholaminmetaboliten bezogen auf die Tagesausscheidung.

Die Objektivierung und Quantifizierung von Auswirkungen physischer und psychischer Belastungen auf den Menschen, insbesondere des Streß im Berufsleben, sind eine bedeutungsvolle Aufgabe der Arbeitsmedizin. Hierbei wird die Schaffung menschengerechter Arbeitsbedingungen und damit eine Humanisierung der Arbeitswelt angestrebt. Neben der Messung von Kreislaufgrößen wie Herzschlagfrequenz und Blutdruck sind auch Messungen biochemischer Parameter in geeigneten Körperflüssigkeiten notwendig. Viele Veränderungen der Körperfunktion unter physischer und psychischer Belastung werden nämlich durch Hormone vermittelt. Es konnte gezeigt werden, daß physischen Belastungen insbesondere eine Erhöhung des Noradrenalinspiegels, psychischen Belastungen eine Erhöhung des Adrenalinspiegels zuzuordnen ist. Im deutschen Sprachraum haben sich insbesondere SELYE (1950), ROHMERT (1973), SCHAEFER (1976), RUTENFRANZ (1976) sowie VALENTIN et al. (1965, 1969, 1973 und 1977) wissenschaftlich um den Zusammenhang zwischen humoralen Vorgängen und Streß bemüht.

Diese arbeitsmedizinischen Aspekte veranlaßten uns, sich mit der Analytik der Catecholamine und ihrer Metaboliten im Urin und Blut zu befassen. Die zu entwickelnden Verfahren sollten sowohl analytisch zuverlässig als auch praktikabel sein, um große Serien analysieren zu können. Die niedrigen

Catecholaminkonzentrationen im biologischen Material stellten dabei hohe Anforderungen an die Empfindlichkeit der Methoden.

Bei der Erstellung der Analysenmethoden wurden die verschiedenen Techniken der Gaschromatographie, der Spektralfluorimetrie, der Radiochemie und der Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie eingesetzt und den jeweiligen Problemstellungen angepaßt.

Über die Ergebnisse dieser Studien soll im folgenden berichtet werden.

2. HAUPTTEIL

Da zum einen im Plasma und Urin sehr differierende Catecholamin-Konzentrationen vorliegen und zum anderen sich auch die beiden Probenmaterialien durch ihre Matrixeffekte stark unterscheiden, wurden zur Erstellung der Analysenmethoden mehrere Analysentechniken, nämlich die Gaschromatographie, die Spektralfluorimetrie, die Radiochemie und die Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie eingesetzt.

2.1 Die gaschromatographische Bestimmung der Catecholamine

2.1.1 Einleitung

Eine direkte gaschromatographische Bestimmung der Catecholamine Adrenalin und Noradrenalin ist wegen der hohen Polarität dieser Verbindungen und der daraus resultierenden geringen Flüchtigkeit nicht möglich. Bei höheren Temperaturen können diese Substanzen nur unter Zersetzung verdampft werden. Um Adrenalin und Noradrenalin dennoch mit Hilfe der Gaschromatographie quantitativ bestimmen zu können, ist es notwendig, stabile und flüchtige Derivate herzustellen.

Catecholamine bilden mit Derivatisierungsreagentien eine Vielzahl von flüchtigen Verbindungen, und

zwar Trifluoracetyl- (IMAI et al. 1971, MARUYAMA u. TAKEMORI 1972, ARNOLD u. FORD 1973, MARTIN u. ANSOLL 1973), Trimethylsilyl- (CANCALON u. KLINGMAN 1972), Pentafluorpropionyl- (ARNOLD u. FORD 1973, KAROUM et al. 1972), Heptafluorobutyryl- (NARASIMHACHARI u. VOUIROS 1972) und Isothiocyanat-Derivate (NARASIMHACHARI 1972).

Nach CAPELLA u. HORNING (1966) besitzen Trimethylsilyl-ether ausreichende Stabilität und Flüchtigkeit, um Catecholamine gaschromatographisch mit einem Flammenionisationsdetektor nachzuweisen. Verschiedene Arbeitsgruppen befaßten sich mit dieser Derivatisierung (BROCHMANN-HANSEN u. SVENDSEN 1962, HORNING et al. 1968, MOFFAT u. HORNING 1970). Wegen der schlechten Nachweisgrenzen kamen diese Studien nie über die Untersuchungen von Standardlösungen hinaus. Zudem eignen sich silylierte Verbindungen wegen der ständigen Verschmutzung des Flammenionisationsdetektor durch Siliciumdioxid relativ schlecht für die gaschromatographische Serienanalyse.

Eine Empfindlichkeitssteigerung beim gaschromatographischen Catecholamin-Nachweis versprach der Einsatz des Elektroneneinfangdetektors (ECD). Eine Vielzahl von Arbeitsgruppen versuchte deshalb die Catecholamine mit perfluorierten Säureanhydriden zu derivatisieren. Dadurch wurde die Flüchtigkeit und auch die Nachweisempfindlichkeit verbessert.

Neuere Verfahren verwenden für die Detektion dieser Catecholaminderivate das Nachweisprinzip der Hochauflösungsmassenfragmentographie. Als Trennungssystem dient die Gaschromatographie (JACOB et al. 1978). Apparative Voraussetzung für die Durchführung dieser Methoden sind hochempfindliche, doppelfokussierende Massenspektrometer mit guter Langzeitstabilität. Diese Verfahren sind jedoch apparativ sehr aufwendig und für den Einsatz in der Routineanalytik nicht geeignet.

Als Derivatbildner kommen insbesondere Tri-fluoressigsäure-, Monochlordifluoressigsäure-, Pentafluorpropionsäure- und Heptafluorbuttersäure-Anhydrid zum Einsatz. Versuche mit diesen Derivatbildnern wurden mehrfach beschrieben (BROOKS u. HORNING 1964, CLARKE et al. 1967, KAWAI u. TAMURA 1968a, KAWAI u. TAMURA 1968b, IMAI u. TAMURA 1969, KAROUM et al. 1972, KOSLOW et al. 1972, SAKAUCHI et al. 1972, GOODWIN et al. 1973, IMAI et al. 1973, WONG et al. 1973, LOVE-LADY u. FORSTER 1975, WANG et al. 1975, HAEFFNER et al. 1976, LOVELADY 1976, MIZUNO 1977).

Wir haben uns daher mit den Möglichkeiten des gaschromatographischen Nachweises der Catecholaminderivate von perhalogenierten Säureanhydriden befaßt.

Insbesondere wurden umfassende Untersuchungen zur Derivatbildung durchgeführt. In präparativen Ansätzen erfolgte eine Strukturaufklärung der

Reaktionsprodukte. Diese wurden dann zur Optimierung der gaschromatographischen Arbeitsbedingungen eingesetzt.

2.1.2 Prinzip der Verfahren

Die Catecholamine werden mit perhalogenierten Säureanhydriden derivatisiert und damit in verdampfbare Verbindungen übergeführt. Nach Entfernung überschüssigen Säureanhydrids erfolgt die gaschromatographische Analyse, wobei die Detektion mit dem Elektroneneinfangdetektor (ECD) erfolgt.

2.1.3 Geräte, Chemikalien

vgl. Kap. 5.1, S. 205

2.1.4 Präparative Vorversuche zur Derivat- bildung von Adrenalin und Noradrenalin mit Trifluoressigsäureanhydrid

Für eine einwandfreie gaschromatographische Bestimmung der Catecholamine ist es notwendig, daß bei der Derivatbildung eine möglichst einheitliche Substanz entsteht, um die einwandfreie Peakidentifikation gewährleisten zu können. Wir haben deshalb in präparativen Ansätzen versucht, die Derivate von Adrenalin bzw. Noradrenalin mit Trifluoressigsäureanhydrid herzustellen und dann mit den Methoden der Massenspektroskopie, der In-

frarotspektroskopie, der Kernresonanzspektroskopie und der Elementaranalyse zu untersuchen. Die Methode für die Herstellung des Adrenalinderivates ist in Kap. 5.1 , S.206 zu finden.

Spektroskopische Untersuchungen

Das bei der Umsetzung entstandene Rohprodukt wurde analytisch untersucht. Dies war notwendig, da bei der gaschromatographischen Bestimmung der Catecholamine im Nano- und Picogrammbereich ebenfalls keine weitere Reinigung durch Destillation erfolgte.

Das H-NMR-Spektrum (Abb. 2) des Rohproduktes zeigt, daß größere Mengen Tetrahydrofuran vorhanden sind. Außerdem kann man die Existenz von Säureprotonen (Singulett im negativen Bereich), die vermutlich von Trifluoressigsäure herrühren, erkennen. Im Massenspektrum (Abb. 3) sind deutlich neben dem gewünschten Adrenalin-Derivat mit dem Molekulargewicht von 567 größere Mengen Tetrahydrofuran (Massenzahl 72) und Trifluoressigsäure (Massenzahl 114) zu sehen. Trifluoressigsäureanhydrid (Massenzahl 210) ist dagegen nicht mehr vorhanden.

Die Strukturaufklärung des destillierten Reinproduktes ergibt, daß die Umsetzung des Adrenalins mit Trifluoressigsäureanhydrid erwartungsgemäß verläuft. Wie man aus dem Formelschema (Abb. 4)

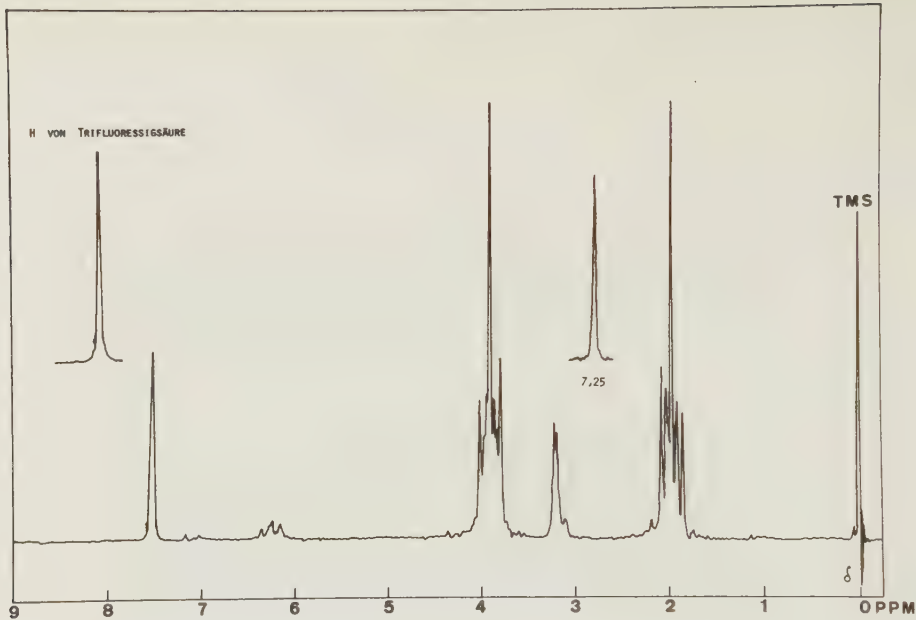


Abbildung 2:
H-NMR-Spektrum des Adrenalin-Rohproduktes

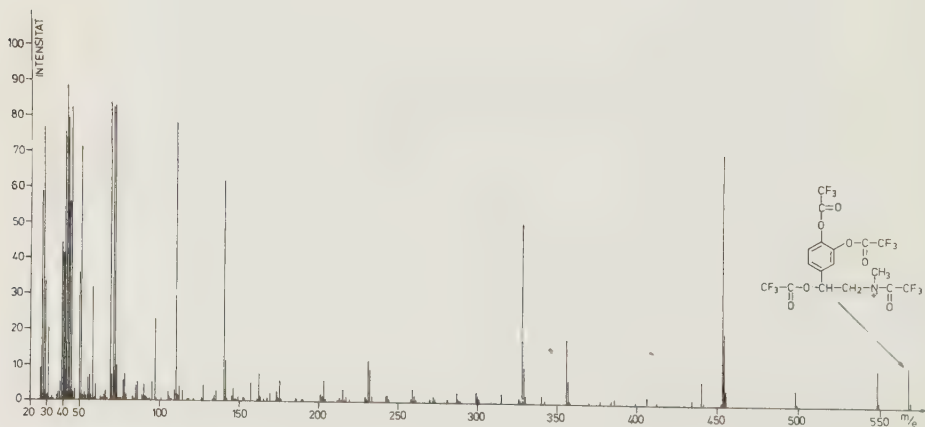


Abbildung 3:
Massenspektrum des Adrenalin-Rohproduktes

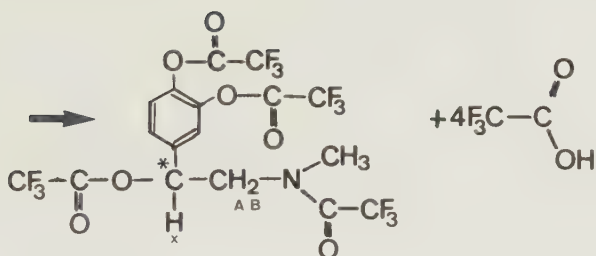
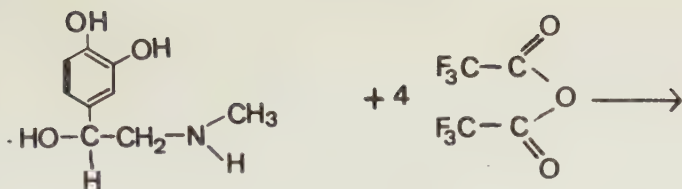


Abbildung 4:
Formelschema für die Umsetzung von Catecholaminen
mit Trifluoressigsäureanhydrid am Beispiel des
Adrenalins

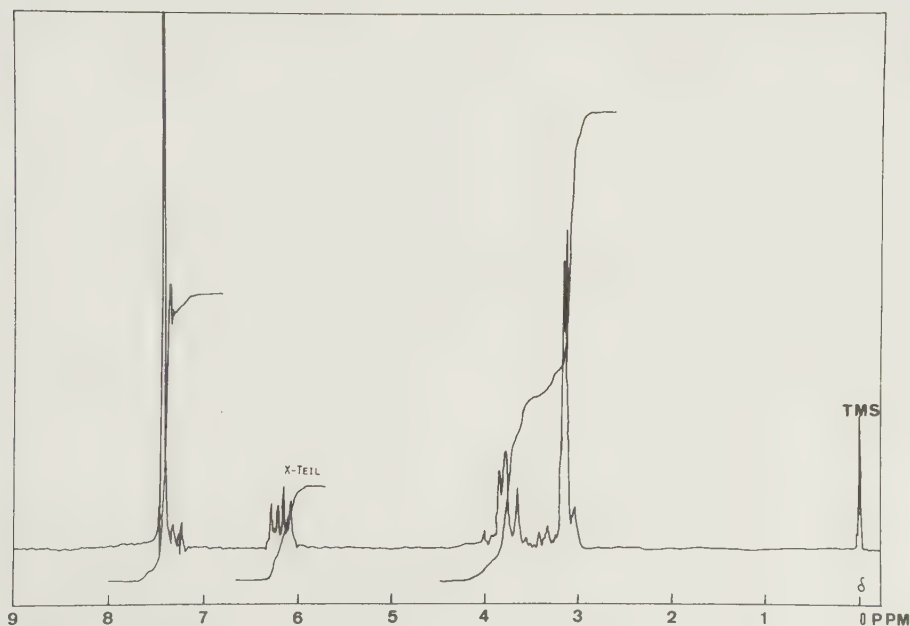
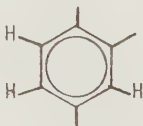


Abbildung 5:
H-NMR-Spektrum des Adrenalin-Derivates

erkennen kann, bildet Trifluoressigsäureanhydrid mit den 3,4-Dihydroxygruppen gemischte Säureanhydride. Die alkoholische OH-Gruppe des Adrenalins bildet einen Trifluoressigsäureester, die sekundäre Aminogruppe ein Säureamid. Die Richtigkeit der beschriebenen Struktur ergibt sich aus den im folgenden diskutierten Spektren.

Im Kernresonanzspektrum H-NMR (Abb. 5) stimmen die Protonenzahlen genau mit den Formeln überein:

Chem. Verschiebung	Signal	Protonen- zuordnung	-zahl
3,25 - 2,93	Triplett		3
3,9 - 3,6	Multipl. (ABX)		2
6,33 - 4,0	x-Teil (ABX)		1
7,25	Singulett		3

Das Infrarotspektrum (Abb. 6) zeigt bei 1800 cm^{-1} die $\text{C}=\text{O}$ Valenzschwingung $\nu_{\text{C}=\text{O}}$ der Estergruppierung $-\text{O}-\text{C}-\text{CF}_3$.

Die $\text{C}=\text{O}$ Doppelbindung $\nu_{\text{C}=\text{O}}$ des Säureamids liegt bei 1680 cm^{-1} . Als breite Bande zwischen 1220 cm^{-1} und 1100 cm^{-1} sind die Valenzschwingungen $\nu_{\text{C}-\text{O}}$ erkennbar. Diesen sind die asymmetrischen und symmetrischen $\nu_{\text{C}-\text{O}}$ der Estergruppierungen bei 1230 cm^{-1} und 1120 cm^{-1} überlagert. Die $\text{C}-\text{F}$ -Valenzschwingungen liegen bei 1170 cm^{-1} .

Aus dem Massenspektrum (Abb. 7) läßt sich eindeutig das Molekulargewicht 567 ablesen. Diese Zahl stimmt mit der berechneten gut überein. Das Molekül-Ion ist gut zu sehen. Die einzelnen Fragmentierungen sind auf dem Spektrum selbst eingezeichnet.

Die Strukturaufklärung des trifluoracetylierten Noradrenalins (Methode für die Herstellung des Noradrenalin-Derivates vgl. Kap. 5.1, S. 207) zeigt, daß die Umsetzung in Analogie zum Adrenalin verläuft. Das gebildete Derivat besitzt die in Abbildung 8 gezeichnete Struktur.

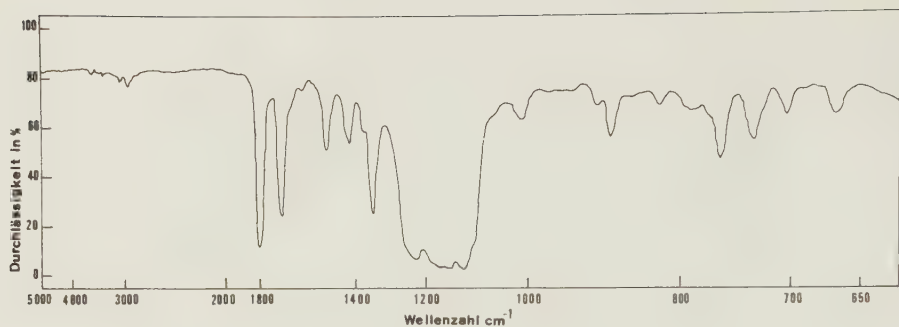


Abbildung 6:
IR-Spektrum des Adrenalin-Derivates

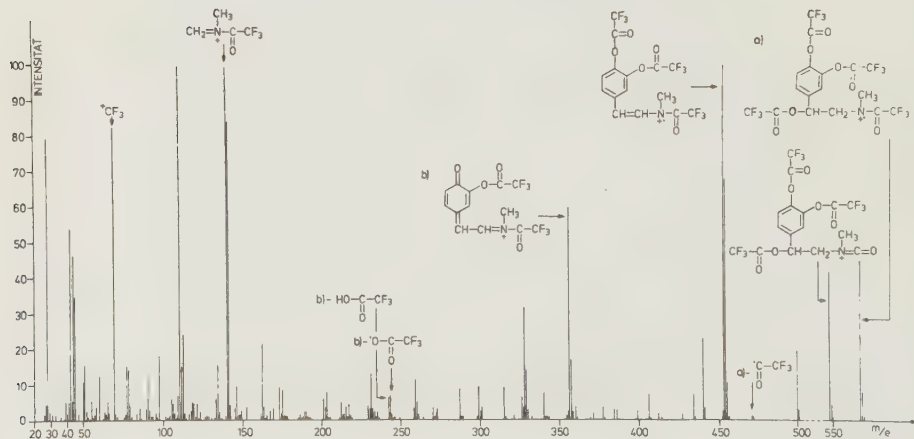


Abbildung 7:
Massenspektrum des Adrenalin-Derivates

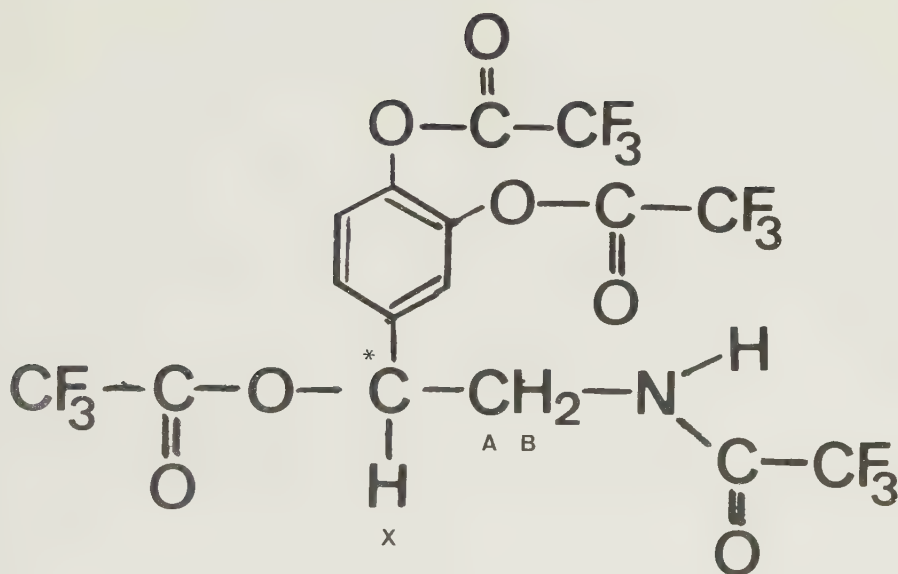


Abbildung 8:
Die Struktur des Noradrenalin-Derivates

Die spektroskopischen Untersuchungen erlauben folgende Schlüsse:

Die Interpretation des Kernresonanzspektrums H-NMR (Abb. 9) ergibt nicht so eindeutige Ergebnisse wie beim Adrenalin.

Chem. Verschiebung	Signal	Protonenzuordnung	Protonenzahl
1,3		Verunreinigung	
4 - 3,6	Triplett	$-\text{CH}_2-\text{N}$	2
6,27 - 5,94	Triplett	$-\text{O}-\underset{\text{H}}{\text{C}}-$	1
7,4 - 6,85	Aromatische Protonen		2
7,47 - 6,85	NH		2

Dies kann zum einen daherrühren, daß das Handelspräparat vom Noradrenalin nicht ausreichende Reinheit besaß. Zum anderen war es durch den Einsatz der geringen Substanzmengen bei der Präparation u.U. nicht möglich, eine hochreine Destillationsfraktion zu erhalten.

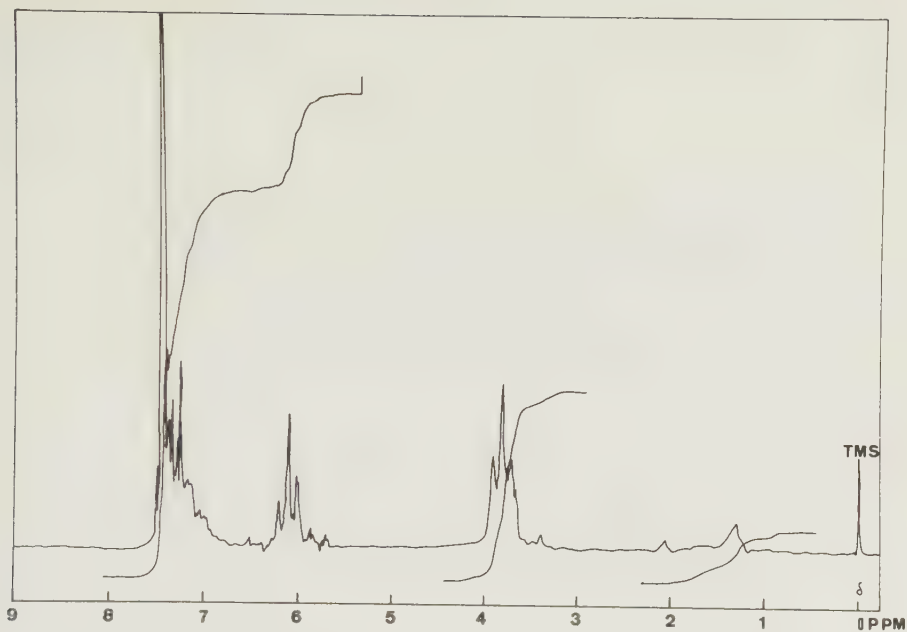


Abbildung 9:
H-NMR-Spektrum des Noradrenalin-Derivates

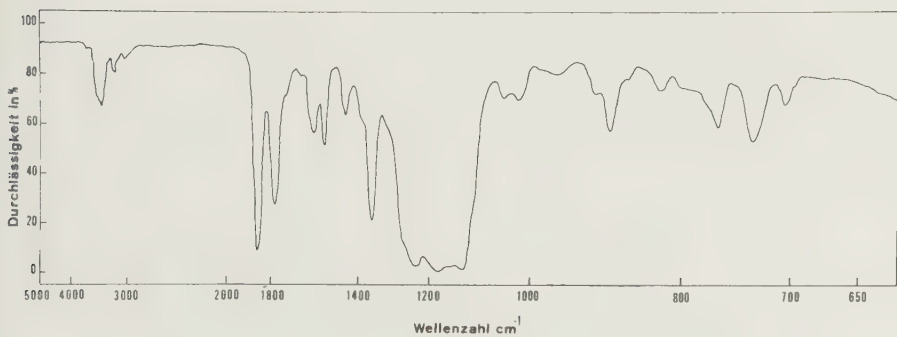


Abbildung 10:
IR-Spektrum des Noradrenalin-Derivates

Das Infrarotspektrum (Abb. 10) des trifluoracetylierten Noradrenalins unterscheidet sich nur unwesentlich vom Adrenalinspektrum. Zusätzlich ist die N-H Valenzschwingung $\nu_{\text{N-H}}$ bei 3370 cm^{-1} und die Deformationsschwingungen $\nu_{\text{N-H}}$ bei 1620 cm^{-1} zu sehen.

Im Massenspektrum (Abb. 11) findet man wieder ähnliche Fragmentierungen wie beim Adrenalinderivat. Das Molekül-Ion N bei 553 ist sehr schlecht erkennbar, da es leichter fragmentiert als das trifluoracetylierte Adrenalin. Die einzelnen Fragmentierungen wurden auf dem Spektrum eingezeichnet. Interessant ist ein Peak mit der Massenzahl 453, welcher mit großer Wahrscheinlichkeit von Adrenalin herrühren kann. Wir schließen daraus, daß das handelsübliche Noradrenalin durch Adrenalin verunreinigt ist.

Da die Trifluoracetyl-Derivate der Catecholamine in relativ reiner Form vorlagen, haben wir versucht, die gaschromatographischen Bedingungen mit Hilfe dieser Standards zu optimieren.

Wir führten diese Versuche am Elektroneneinfangdetektor durch. Zum Einsatz kamen als stationäre Phasen 2% OV 17 und 1% XF 1105. Die Glassäulen hatten 1/4" Außendurchmesser. Brauchbare Ergebnisse konnten allerdings nur mit dem Säulenfüllmaterial 2% OV 17 bei einer Säulenlänge von 2,1 m erzielt werden. Das Säulenfüllmaterial XF 1105

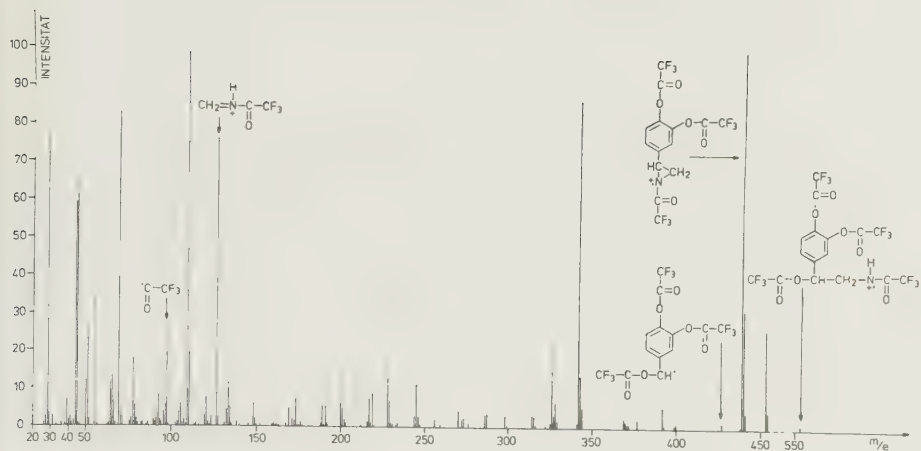


Abbildung 11:
Massenspektrum des Noradrenalin-Derivates

brachte keine Auftrennung der Adrenalin bzw. Noradrenalin-Derivate.

Als gute Lösungsmittel erwiesen sich Benzol und Tetrahydrofuran. Bei der Verwendung von Tetrahydrofuran p.A. für die Verdünnungsreihen zeigte sich, daß eine Zersetzung, insbesondere Hydrolyse der Derivate eintritt. Der Wassergehalt dieses Lösungsmittels beträgt bei frisch geöffneten Flaschen max. 0,01%. Diese geringe Wassermenge reichte aber anscheinend bereits aus, um bei geringen Derivatkonzentrationen Spaltungen hervorzurufen.

Erklären kann man dies damit, daß die Trifluoressigsäure, welche bei der Hydrolyse der Adrenalin- bzw. der Noradrenalin-Derivate entsteht, eine sehr starke organische Säure ist. Demgemäß spaltet sich diese Säuregruppierung auch leicht aus Estern und Säureamiden wieder ab. Versuche mit trifluoracetylierten Aminen und Alkoholen zeigten jedoch, daß bei kurzfristigem Stehenlassen in wässrigen Lösungen die Hydrolyse von Estern und Säureamiden vernachlässigt werden kann. Dagegen hydrolysierten die aus den 3,4-Dihydroxyphenolen mit Trifluoressigsäureanhydrid entstehenden gemischten Säureanhydride in Gegenwart geringster Spuren von Wasser sofort. Sichtbar wurde die Unbeständigkeit der Derivate durch Gelbfärbung der Standardlösungen. Lichteinfluß beschleunigte außerdem diese Reaktion.

Wir verwendeten daher für die weiteren Versuche ein speziell absolutiertes Tetrahydrofuran. Es wurde mit Natriumdraht vorgetrocknet, mit Lithiumalanat (LiAlH_4) von Restspuren Wasser befreit und anschließend unter Stickstoff destilliert. Das Probenmaterial setzten wir nicht länger als notwendig dem Tageslicht aus und öffneten die Gefäße nur unter einem Strom von vorgetrocknetem Stickstoff. Die Gelbfärbung der Lösungen blieb nun aus und in den Chromatogrammen war die Vielzahl von Peaks, welche von Zerstellungsprodukten herrührten, nicht mehr zu entdecken.

2.1.5 Gaschromatographische Untersuchungen

2.1.5.1 Derivatisierung der Catecholamine mit Trifluoressigsäureanhydrid

Die Arbeitsvorschrift für die Herstellung des Derivates und die GC-Bedingungen sind in Kap. 5.1, S. 207 zusammengestellt.

In Abbildung 12 ist eine gaschromatographische Trennung der trifluoracetylierten Derivate von Adrenalin und Noradrenalin mit der stationären Phase OV 17 zu sehen. Die Retentionszeit für Adrenalin beträgt 2 Minuten, die für Noradrenalin

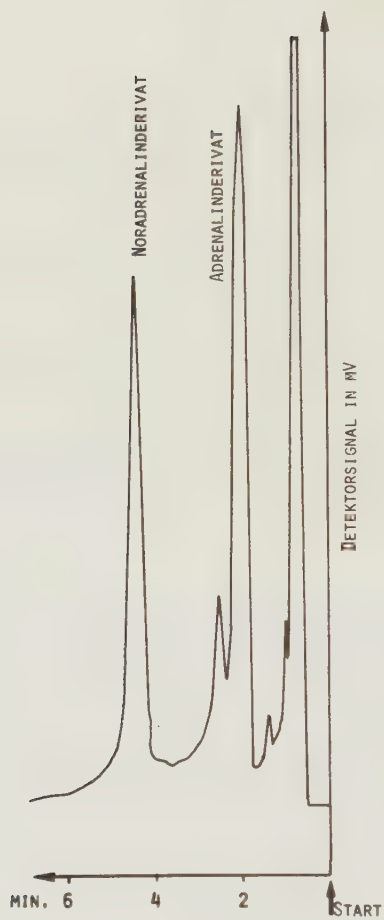


Abbildung 12:
Gaschromatographische Trennung des trifluor-
acetylierten Adrenalins und Noradrenalins auf
OV 17

4,5 Minuten. Als Nachweisgrenzen können wir bei einem Peak-Rausch-Verhältnis von 5:1 50 ng Catecholamin pro Injektion angeben.

Eine ähnliche Trennung der Catecholamin-Derivate konnte mit dem Material QF 1 erzielt werden (Abb. 13). Die GC-Bedingungen sind in Kap. 5.1, S.209 nachzulesen.

Die Retentionszeiten betragen für das Adrenalin-derivat 3,6 min., für das Noradrenalin-derivat 4,5 min.

2.1.5.2 Derivatisierung der Catecholamine mit Monochlordifluoressigsäureanhydrid

Die Derivatbildung erfolgte unter Einsatz von Monochlordifluoressigsäureanhydrid in derselben Weise, wie in Kap. 5.1, S.207 beschrieben. Die GC-Bedingungen finden sich in Kap. 5.1, S.210

Abbildung 14 zeigt die gaschromatographische Auftrennung der entsprechenden Derivate von Adrenalin und Noradrenalin. Die Retentionszeiten liegen für Adrenalin bei 9 Minuten, für Noradrenalin bei 4 Minuten. Bei einem Peak-Rausch-Verhältnis von 5:1 betragen die Nachweisgrenzen ca. 10 ng/Injektion.

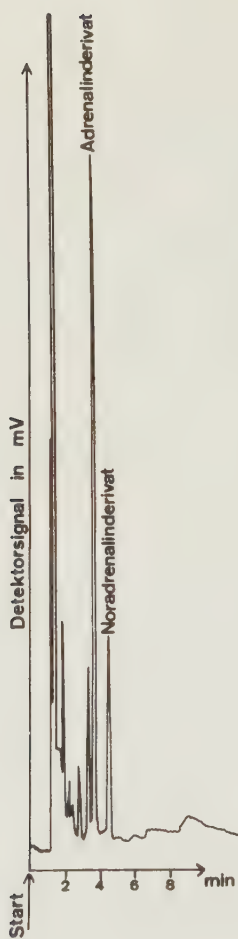


Abbildung 13:
Gaschromatographische Trennung des trifluor-
acetylierten Adrenalins und Noradrenalins auf
QF 1

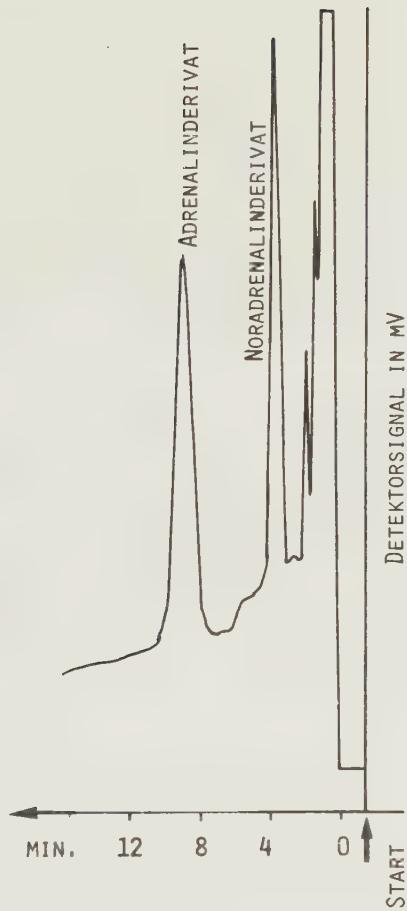


Abbildung 14:
Gaschromatogramm der Derivate von Adrenalin und
Noradrenalin mit Monochloridfluoressigsäure-
anhydrid

2.1.5.3 Derivatisierung der Catecholamine mit Pentafluorpropionsäureanhydrid

Die Derivatisierung erfolgt wie unter Kap. 5.1, S. 207 beschrieben. Es werden jedoch 150 µl Pentafluorpropionsäureanhydrid eingesetzt. Die GC-Bedingungen sind in Kap. 5.1, S.211 aufgeführt.

In Abbildung 15 ist eine gaschromatographische Trennung der Pentafluorpropionsäureanhydrid-Derivate der Catecholamine zu sehen. Die Retentionszeiten für Adrenalin bzw. Noradrenalin sind 14,4 respektive 35 Minuten. Die Nachweisgrenzen für die Pentafluorpropionsäure-Derivate betragen bei einem Peak-Rausch-Verhältnis von 5:1 5 ng/Injektion.

2.1.5.4 Derivatisierung der Catecholamine mit Heptafluorbuttersäureanhydrid

Die Derivatisierung wurde wie in Kap. 5.1, S.207 mit 100 µl Heptafluorbuttersäureanhydrid ausgeführt. Die GC-Bedingungen finden sich in Kap. 5.1, S. 211

Eine Trennung der Heptafluorbuttersäureanhydrid-Derivate von Adrenalin und Noradrenalin ist in Abbildung 16 abgebildet. Die dargestellten Peaks



Abbildung 15:
Gaschromatogramm der Derivate von Adrenalin und
Noradrenalin mit Pentafluorpropionsäureanhydrid

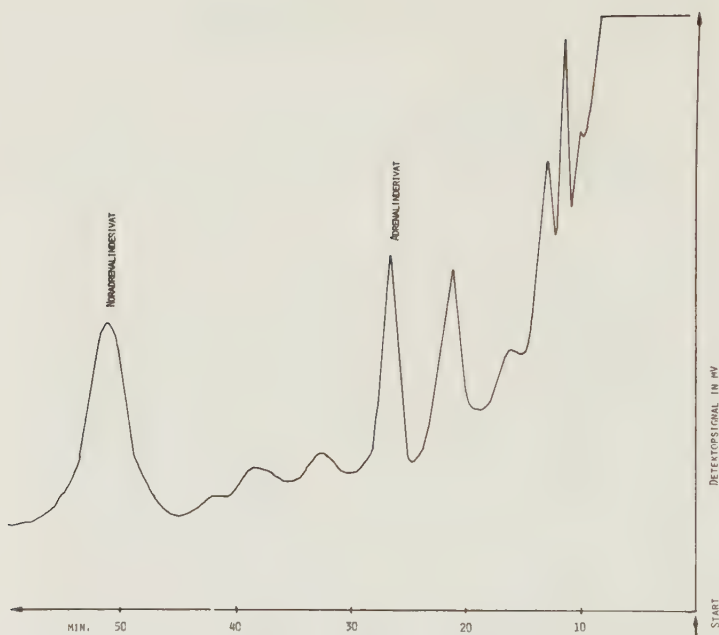


Abbildung 16:
Chromatogramm der Derivate von Adrenalin und
Noradrenalin mit Heptafluorbuttersäureanhydrid

sind relativ breit. Die Retentionszeiten betragen für Adrenalin 26,2 Minuten, für Noradrenalin 50,8 Minuten. Als Nachweisgrenzen werden für das Noradrenalin 1 ng/Injektion, für das Adrenalin 10 ng/Injektion ermittelt.

2.1.6 Diskussion

Für den gaschromatographischen Nachweis mit dem ECD mußten die Catecholamine Adrenalin und Noradrenalin derivatisiert werden. Als Derivatbildner haben wir Trifluoressigsäureanhydrid, Monochlordifluoressigsäureanhydrid, Pentafluorpropionsäureanhydrid, Heptafluorbuttersäureanhydrid und Trichloressigsäureanhydrid eingesetzt. Im Gaschromatogramm konnte für die entsprechenden Reaktionsprodukte, ausschließlich der Trichloressigsäure-Derivate, jeweils eine Peakzuordnung vorgenommen werden. Eine Zusammenstellung der für die verschiedenen Derivatbildner erhaltenen Retentionszeiten von Adrenalin und Noradrenalin und der Nachweisgrenzen findet sich in Tabelle 3.

Versuche, die Catecholamine mit Trichloressigsäureanhydrid zu derivatisieren, schlugen fehl. Es konnte in diesem Fall keine Peakzuordnung getroffen werden. Die entstehenden Derivate sind vermutlich so hochsiedend, daß keine gaschromatographische Analyse möglich ist.

Derivatbildner	Retentionszeit der Derivate in Minuten		Nachweisgrenzen ng(Injektion)
	Adrenalin	Noradrenalin	
Trifluoressigsäure- anhydrid	3,6	4,5	50
Monochlordifluoressig- säureanhydrid	9	4	10
Pentafluorpropionsäure- anhydrid	14,4	35	5
Heptafluorbuttersäure- anhydrid	26,2	50,8	1 (Noradrenalin) 10 (Adrenalin)
Trichloressigsäure- anhydrid	keine Peaks		

Tab. 3: Retentionszeiten und Nachweisgrenzen der verschiedenen Derivate
von Adrenalin und Noradrenalin

Obwohl sich die verschiedenen Catecholamin-derivate herstellen und chromatographieren ließen, muß aufgrund der Untersuchungsergebnisse und der gewonnenen Erfahrungen der gas-chromatographische Nachweis von Catecholaminen aus Urin bzw. Plasma als wenig realistisch erscheinen. Diese Aussage stützt sich auf folgende Beobachtungen:

1. Es konnten keine linearen Eichkurven erhalten werden. Hierfür sind verschiedene Erscheinungen verantwortlich zu machen. Zum einen zeigten selbst die handelsüblichen "pro analysi" - Lösungsmittel am Elektroneneinfangdetektor Signale mit einem ausgeprägten "tailing", so daß für die Catecholamin-Derivate zumeist keine Basislinientrennung erhalten werden konnte.
2. Es wurde eine Vielzahl von störenden Peaks beobachtet. Diese konnten auch von Reagenzienleerwerten erhalten werden. Man weiß, daß die ubiquitär vorhandenen Pestizide auch in reinen Lösemitteln und Reagenzien vorkommen (vgl. Firmenschrift MERCK "Lösemittel zur Rückstandsanalytik").

Als eine weitere Störquelle erwies sich der Einsatz von Einmal-Plastikartikeln bei der Ausführung der Analysen. Diese Plastikmaterialien gaben Substanzen ab, welche am ECD als Peaks beobachtet werden konnten.

3. Ebenfalls störend bei der Ausführung der Untersuchungen war der sog. "memory-Effekt". Dies bedeutet, daß nach der Injektion des Probenmaterials auch beim Einspritzen reiner Lösungsmittel dieselben Peakmuster wie bei den vorhergehenden Injektionen beobachtet werden konnten.

Grundsätzlich läßt sich ein "memory-Effekt" in der Gaschromatographie auf folgende Fehlerquellen zurückführen:

- a) Verunreinigung der GC-Spritzen durch Adsorption des Probenmaterials an Glaswandungen und Stempel.
- b) Kontamination des Septums.
- c) Adsorption des Probenmaterials an die Glaswolle des Säuleneingangs (die Glaswolle war stets silanisiert).
- d) Adsorption des Probenmaterials an das Säulenfüllmaterial.

Bei nachfolgenden Injektionen von reinen Lösemitteln könnten durch sog. Verdrängungseffekte die Derivate von Septum, Glaswolle oder Säule eluiert werden.

Die Ursache für den starken "memory-Effekt" bei der Injektion perfluoracetylierter Catecholaminderivate konnte nicht befriedigend geklärt werden. Trotz gründlicher Reinigung der Spritzen, Auswechseln des Septums und der Glaswolle wurden diese Effekte nicht vollständig beseitigt. Wir sind daher der Ansicht, daß die im Punkt d) vorgeschlagene Möglichkeit, nämlich die Adsorption eines Teils der Derivate an das Säulenfüllmaterial, die Ursache des "memory-Effekts" sein könnte. Hierbei muß auch beachtet werden, daß Pyrolyse-Produkte der Catecholaminderivate auf der Trennsäule haften bleiben.

Neben diesen erwähnten Nachteilen müssen bei der gaschromatographischen Bestimmung der Catecholamine grundsätzlich theoretische Überlegungen über die Siedepunkte mit in die Diskussion einbezogen werden.

In unserem präparativen Ansatz der trifluoracetylierten Derivate von Adrenalin und Noradrenalin hatte sich bei der Destillation für das Adrenalin-Derivat, umgerechnet auf 760 Torr, ein Kondensationspunkt von etwa 380°C, für das

Noradrenalin-Derivat von etwa 460°C ergeben.

Die meisten Autoren und auch die eigenen Untersuchungen beschreiben für den gaschromatographischen Nachweis der Catecholamine als perfluoracetylierte Substanzen Säulentemperaturen um und unter 200°C. Bekanntlich lassen sich aber Substanzen meist nur bis max. etwa 100°C unterhalb ihres Siedepunktes gaschromatographisch untersuchen. Diese Überlegungen machen deutlich, daß evtl. beobachtete Peaks mit diesen kurzen Retentionszeiten nicht von einem intakten Derivat herrühren können. Eine Peakidentifizierung mit Hilfe der Gaschromatographie-Massenspektroskopie war uns aus technischen Gründen leider nicht möglich. Versuche mit dieser Technik liegen von anderen Stellen vor. Wir vermuten, daß bei den in der Literatur beschriebenen Methoden nicht die acetylierten Adrenalin- bzw. Noradrenalin-Derivate, sondern irgendwelche Bruchstücke gemessen werden. Diese entstehen nach unserer Ansicht durch Pyrolyse der Derivate im Einspritzblock oder durch Zersetzung der Substanzen auf der Trennsäule. Das könnte die Erklärung dafür sein, daß selbst die präparativ hergestellten Catecholamin-Derivate bei der Injektion in den Gaschromatographen keine einheitlichen Peaks ergeben. Eine Hydrolyse der Derivate ist durch die Verwendung wasserfreier Lösungsmittel auszuschließen.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß aufgrund unserer experimentellen Untersuchungen und theoretischer Überlegungen die Gaschromatographie für den Nachweis der Catecholamine in biologischem Material nicht geeignet ist. Dies gilt sowohl für die verschiedenartigsten Derivatisierungen als auch für den Einsatz des Flammenionisationsdetektor oder des Elektroneneinfangdetektors. In beiden Fällen reichen neben der Störanfälligkeit der Methoden die erzielten Nachweisgrenzen nicht aus. Uns ist trotz einer Vielzahl von Veröffentlichungen methodischer Arbeiten über die quantitative gaschromatographische Bestimmung der Catecholamine keine Publikation bekannt, in der die beschriebenen Verfahren in der Routine eingesetzt wurden.

2.2 Die spektralfluorimetrische Bestimmung der Catecholamine in Urin und Plasma

2.2.1 Einleitung

Zur Bestimmung von Adrenalin und Noradrenalin im biologischen Material wurden schon frühzeitig fluorimetrische Meßtechniken vorgeschlagen und beschrieben. Es können prinzipiell entweder die Ethylendiaminmethode oder die Trihydroxyindol-

methode verwendet werden (WEIL-MALHERBE und BONE 1957, LUND 1949).

Bei der Ethylendiaminmethode werden die Catecholamine mit Kaliumhexacyanoferrat(III) oxidiert und anschließend mit Ethylendiamin in ein Chin-oxalinderivat (Adrenalin) bzw. ein Tetraanthracenderivat (Noradrenalin) überführt. Diese Verbindungen sind fluoreszierend. Die getrennte Bestimmung der Catecholamine erfolgt bei dieser Methode aufgrund der Unterschiede in den Spektren der Fluorophore. Dopamin wird mit diesem Verfahren bisher nicht erfaßt.

Bei der Trihydroxyindolmethode werden die Catecholamine nach der Abtrennung aus dem biologischen Material durch Oxidation mit Kaliumhexacyanoferrat(III) in die stark fluoreszierenden Verbindungen Adrenochrom bzw. Noradrenochrom umgewandelt (Abb. 17). Als Oxidationsmittel kann auch Jod oder Wasserstoffperoxid eingesetzt werden. Adrenochrom und Noradrenochrom sind gegen Luft-sauerstoff äußerst empfindlich. Ohne Stabilisation würde die Fluoreszenz dieser Verbindungen sehr bald verschwinden und damit eine quantitative Messung unmöglich machen. Man gibt daher einen Überschuß von Ascorbinsäure zu den Lösungen. Dadurch werden zum einen Adreno- bzw. Noradrenochrom reduziert und zwar zu dem entsprechenden Adrenolutin bzw. Noradrenolutin. Diese Verbindungen sind Derivate des Trihydroxyindols (THI). Deshalb wird diese

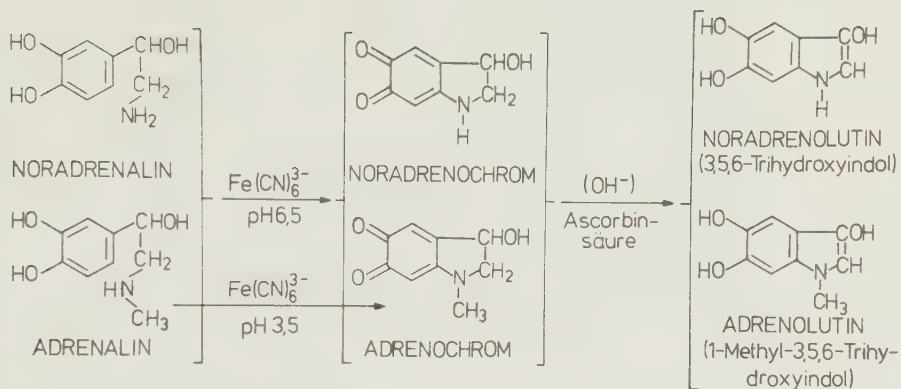


Abbildung 17:
Chemische Umsetzung beim Trihydroxyindol-
verfahren

Methode auch als Trihydroxyindolverfahren bezeichnet. Zum anderen verhindert die Ascorbinsäure die Oxidation der Lutine durch den Luft-sauerstoff. Aufgrund der Oxidationspotentiale oxidiert der gelöste Sauerstoff bevorzugt die Ascorbinsäure.

Durch diese Reaktion lassen sich 3,4-Dihydroxyphenylalanin (Dopa), Dopamin, Noradrenalin, Adrenalin, 3-Methoxytyramin, Metanephrin, Normetanephrin und Homovanillinsäure (3-Methoxy-4-hydroxy-phenylelessigsäure) zu den entsprechenden Lutinen umwandeln. Die Derivate ermöglichen den Catecholaminnachweis im unteren Nanogrammbereich.

Die Ethylendiaminmethode unterscheidet sich von der Trihydroxyindolmethode in Spezifität und Empfindlichkeit. Ethylendiamin reagiert mit allen Dihydroxyphenylverbindungen, während die THI-Methode in der Hauptsache Dihydroxyphenylverbindungen, welche eine Seitenkette mit einer Hydroxyl- und Aminogruppe besitzen, erfasst. Das Verfahren über die Ethylendiaminreaktion ist empfindlicher, aber weniger spezifisch.

Für die quantitative Bestimmung der Urin-Catecholamine ist die Fluorimetrie ein seit langem anerkanntes praktikables Verfahren. Basierend auf Arbeiten von EHRLÉN (1948), LUND (1949), EULER und

FLODING (1955), WEIL-MALHERBE (1961 und 1964), ANTON u. SAYRE (1962), HÄGGENDAL (1963) und UDENFRIEND (1964) ist es gelungen, die spektralfluorimetrische Bestimmung der Catecholamine im Urin zu einem klinischen Routineverfahren auszuarbeiten. In neueren Untersuchungen von COMOY u. BOHUON (1970), WISSER (1970), WISSER u. KNOLL (1973), PEYRIN u. COTTET-EMARD (1973), SCHWEDT (1974), QUEK et al. (1975), WERNER (1975), BUSSEMAS et al. (1977) SCHWARZ (1977) und de SCHAEPPDRYVER u. MOERMANN (1978) wurde dieses Verfahren weiter verfeinert. Insbesondere haben diese Autoren daran gearbeitet, die "Kreuz-Reaktion" zwischen Adrenalin und Noradrenalin auf wenige Prozente zu erniedrigen.

Demgegenüber ist die Messung der Plasma-Catecholamine wegen der im Picogramm-Bereich liegenden Konzentrationen mit vielen Fehlerquellen behaftet. Von einigen Autoren wird auch heute noch die Spezifität dieser Meßmethoden im Gebiet der Nachweisgrenzen bezweifelt (UDENFRIEND 1964, MÄURER 1974). Besonders problematisch ist dabei die Adrenalinanalyse.

Die ersten Verfahren zur spektralfluorimetrischen Bestimmung der Plasma-Catecholamine wurden von LUND (1949), WEIL-MALHERBE u. BONE (1952, 1953, 1954), KÄGI et al. (1957), ANTON u. SAYRE (1962), HÄGGENDAL (1963) und VIKTORA et al. (1968) be-

schrieben. Diese Methoden operieren alle im Bereich der Nachweisgrenzen. Sie sind daher mit relativ großen analytischen Fehlern und einer hohen Unspezifität verbunden.

In den letzten Jahren hat die schnell fortschreitende Entwicklung beim Bau hochempfindlicher Spektralfluorimeter und die Ausarbeitung von optimierten Methoden die Fluorimetrie wieder für die Analyse der Plasma-Catecholamine in die Diskussion gebracht. Man erhoffte sich eine Verbesserung der Nachweisgrenze und dadurch eine Steigerung der Spezifität. Derartige neuere Verfahren wurden von vielen Arbeitsgruppen beschrieben (Mc CULLOUGH 1968, GRIFFITHS et al. 1970, RENZINI et al. 1970, O'HANLON 1970, ENDEL u. HOLLMANN 1970, TURTON u. DEEGAN 1973, JIANG et al. 1973 u. 1976, FRIEDMAN et al. 1975, DIAMANT u. BYERS 1975, WOOD u. MAINWARING-BURTON 1975, CAMPUZANO et al. 1975, ROBINSON 1977 u. MIURA et al. 1977). Um dieser Entwicklung Rechnung zu tragen, haben auch wir uns mit dem spektralfluorimetrischen Nachweis der Catecholamine in Urin und Plasma beschäftigt. Neben Versuchen zur Optimierung der fluorimetrischen Endpunktsbestimmung haben wir sowohl verschiedene Austauschharze als auch Aluminiumoxid für die gaschromatographische Abtrennung der Catecholamine aus dem biologischen Material getestet. Die Ergebnisse der experimentellen Untersuchung werden im folgenden wiedergegeben und diskutiert.

2.2.2 Prinzip der Verfahren

Die Catecholamine Adrenalin und Noradrenalin werden nach dem Trihydroxyindolverfahren in ihre fluoreszierenden Produkte umgewandelt. Zur fraktionierten Bestimmung von Noradrenalin und Adrenalin stehen zwei Möglichkeiten zur Verfügung: entweder man macht sich die, wenn auch nur geringfügig unterschiedliche Fluoreszenzcharakteristik von Noradrenalin und Adrenalin zunutze und regt mit 335 nm bzw. 385 nm an, oder man bedient sich des unterschiedlichen Reaktionsverhaltens der beiden Amine im neutralen und sauren Milieu. Im sauren pH-Bereich wird fast ausschließlich die vom Adrenalin entwickelte Fluoreszenz gemessen. Im neutralen pH-Bereich fluoreszieren beide Amine etwa gleich stark. Damit errechnet sich die Noradrenalin-Fluoreszenz aus der Differenz der Gesamtfluoreszenz von Noradrenalin und Adrenalin bei einem pH von 6,6 und der Adrenalin-Fluoreszenz bei pH 2,0.

Diese beiden Verfahren können zur fraktionierten Bestimmung von Adrenalin und Noradrenalin kombiniert werden. Verwendet man einmal verschiedene Anregungswellenlängen und zum anderen unterschiedliche pH-Werte bei der Umsetzung, so kann die Überlappung der Fluoreszenzintensitäten von Adrenalin und Noradrenalin unter 1% liegen.

Vor der fluorimetrischen Endpunktsbestimmung ist es zunächst notwendig, die Catecholamine aus den biologischen Körperflüssigkeiten möglichst selektiv abzutrennen. Die Catecholamine kommen sowohl im Blut als auch im Urin in sehr geringen Mengen vor. Alle ähnlich fluoreszierenden Substanzen müssen daher durch geeignete Probenaufbereitung eliminiert werden.

Durch eine Flüssig-Flüssig-Extraktion können die Catecholamine aus Blut und Urin isoliert werden. Die Catecholamine besitzen amphotere Eigenschaften und bilden innere Salze. Wegen ihrer hohen Polarität lassen sie sich daher nur äußerst schlecht in organische Lösungsmittel extrahieren.

Zur Abtrennung der Catecholamine aus dem biologischen Material finden in der Praxis vor allem zwei Verfahren Anwendung. Es handelt sich um die Ionenaustauscher-Chromatographie und die Adsorption an Aluminiumoxid ("Batch-Verfahren"). Durch die Optimierung der pH-Werte während der Adsorption können diese beiden Methoden relativ selektiv eingesetzt werden. Die Elution der Catecholamine von den Ionenaustauscherharzen bzw. vom Aluminiumoxid kann mit verdünnten Säuren erfolgen. Besonders geeignet ist die Elution - wie wir in den Versuchen zeigen konnten - mit Borsäure, da sie mit den Catecholaminen einen Komplex bildet.

2.2.3 Versuchsbeschreibungen

2.2.3.1 Geräte und Chemikalien

vgl. Kap. 5.2, S. 212

2.2.3.2 Probenlagerung

vgl. Kap. 5.2, S. 212

2.2.3.3 Versuche zur fluorimetrischen End- punktsbestimmung

Für die Oxidation der Catecholamine zu den Lutinen verwendeten wir sowohl Jod als auch Kaliumhexacyanoferrat(III). Die verschiedenen Oxidationen wurden mit wässrigen Standardlösungen von Adrenalin und Noradrenalin ohne Probenaufbereitung vorgenommen.

2.2.3.3.1 Oxidation mit Jod

Die Jod-Oxidation erfolgte entsprechend den Angaben von CAMPUZANO et al. (1975).

Die Fluoreszenzspektren des bei der Oxidation entstehenden Adrenolutins bzw. Noradrenolutins (jeweils bei einer Konzentration von 10^{-6} g/ml)

sind aus den Abbildungen 18 und 19 ersichtlich.
In Abhängigkeit vom analysierten Catecholamin
wurden folgende Anregungs- bzw. Emissions-
wellenlängen gewählt:

	Anregungswellen- längen	Emissionswellen- längen
Adrenalin	406 nm	500 nm
Noradrenalin	360 nm	467 nm

Die Adrenalin- und Noradrenalin-Lösungen wur-
den sowohl allein als auch in Gegenwart des
anderen Catecholamins fluorimetrisch unter-
sucht. Die eingesetzten Konzentrationen be-
trugen 0; 0,1; 1; 10 und 100 ng Catechol-
amin/ml 0,025 N HCl. Folgende Fluoreszenzein-
heiten bei der Noradrenalin-Bestimmung haben
wir gemessen:

Noradrenalin (ng/ml)	Fluoreszenz (Skt)	Fluoreszenz (Skt) in Gegenwart einer gleich- großen Adrenalin-Kon- zentration
0	20,7	20,7
0,1	30,3	26,5
1,0	43,0	36,4
10,0	109,0	101,0
100,0	680,0	867,0

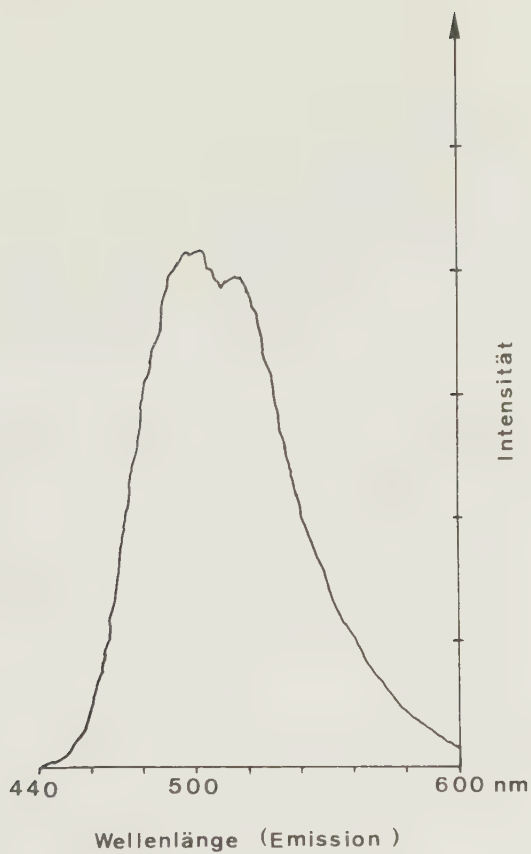


Abbildung 18:

Fluoreszenzspektrum von Adrenolutin
Anregungswellenlänge 406 nm

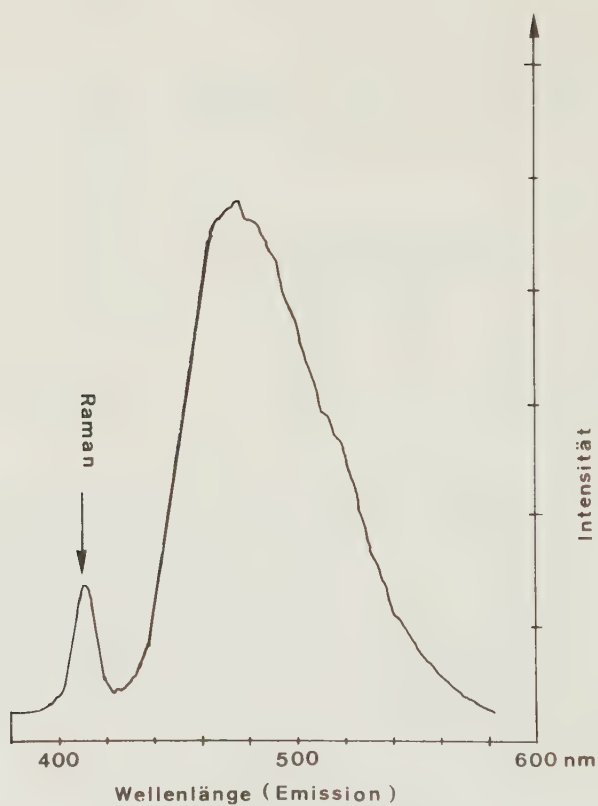


Abbildung 19:
Fluoreszenzspektrum von Noradrenolitin
Anregungswellenlänge 360 nm

Die mit diesen Meßwerten erhaltenen linearen Eichkurven sind aus Abbildung 20 ersichtlich. Die Bestimmung von Noradrenalin wird in Gegenwart von Adrenalin nur geringfügig gestört.

Analog ergeben sich für die Adrenalin-Eichkurven folgende Fluoreszenzwerte:

Adrenalin (ng/ml)	Fluoreszenz (Skt)	Fluoreszenz (Skt) in Gegenwart einer gleich- großen Noradrenalin- Konzentration
0	16,0	24,0
0,1	20,0	35,0
1,0	25,0	40,0
10,0	50,3	77,5
100,0	297,0	360,0

Graphisch sind diese Eichkurven in Abbildung 21 wiedergegeben.

Auch hier läßt sich feststellen, daß die Adrenalinbestimmung nur geringfügig durch Noradrenalin gestört wird. Dies gilt für annähernd gleichgroße Konzentrationen an Adrenalin und Noradrenalin. Verschieben sich die Mengenverhältnisse wesentlich, so werden größere In-

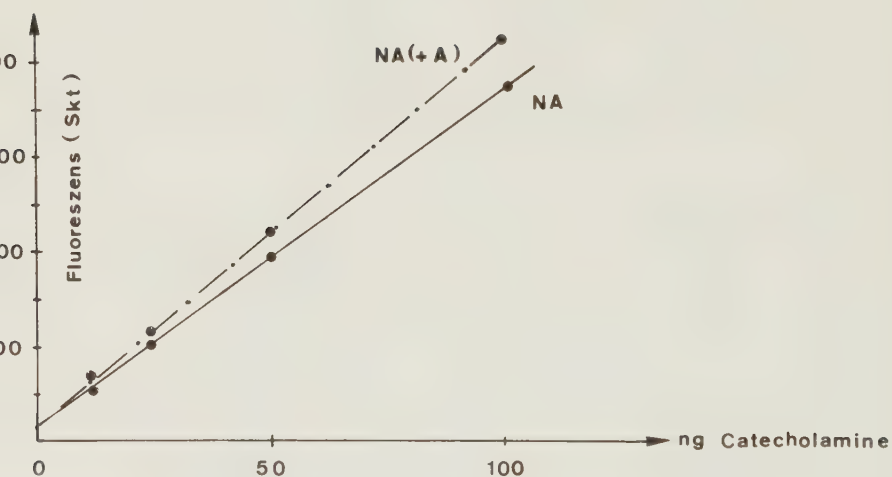


Abbildung 20:
Eichkurve für die fluorimetrische Analyse von
Noradrenalin-Standardlösungen allein und in
Gegenwart von Adrenalin

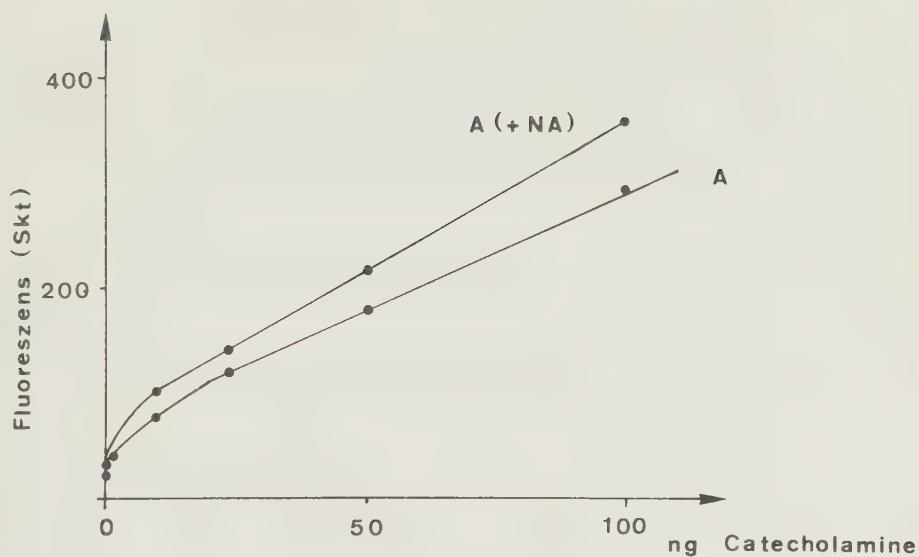


Abbildung 21:

Eichkurve für die fluorimetrische Analyse von Adrenalin-Standardlösungen allein und in Gegenwart von Noradrenalin

teraktionen beobachtet. Für beide Substanzen gilt, daß bei Meßergebnissen in der Nähe des Leerwertes und hiermit der Nachweisgrenze die Streuung sehr groß ist. 100 pg Catecholamin/ml weisen noch deutliche Fluoreszenzunterschiede gegenüber Leerwerten auf.

2.2.3.3.2 Oxidation mit Kaliumhexacyanoferrat (III)

Die Oxidation der Catecholamine mit Kaliumhexacyanoferrat wurde analog der Arbeitsanleitung "differentielle Analyse von Adrenalin und Noradrenalin" der Fa. BIO RAD-Laboratories, München, durchgeführt. Die Oxidation der Gesamtcatecholamine haben wir bei pH 6,5, die des Adrenalins bei pH 3,5 vorgenommen. Gemessen wurden Adrenalin- bzw. Noradrenalin-Standardlösungen mit 0; 1; 10 und 50 ng Catecholamin/ml 4%iger Borsäure. Zu jeder dieser Standardproben mißt man einen Leerwert. Der Eichpunkt Null entspricht dem Reagenzienleerwert.

Arbeitsvorschrift

vgl. Kap. 5.2, S. 213

Fluoreszenzmessung:

Für die Messung der Fluoreszenz verwendeten wir ein Spektralfluorimeter. Die Anregungswellenlänge lag bei 402 nm und die Emissionswellenlänge bei 505 nm. Es wurden Quarzküvetten (1x1x3 cm) benutzt.

Die erhaltenen Eichkurven sind in Abbildung 22 dargestellt.

Als Nachweisgrenzen ergeben sich ca. 500 pg Catecholamin/ml 4%iger Borsäure.

2.2.3.4 Versuche zur Probenvorbereitung

Abtrennung der Catecholamine aus dem Urin

Die Versuche zur Ionenaustauscherchromatographie erfolgten mit verschiedenen Harzen unterschiedlicher Korngröße. Zur Vorbereitung wurden variierende Konditionierungsarten eingesetzt. Die Adsorptionschromatographie testeten wir mit saurem, neutralem und alkalischem Aluminiumoxid im "Batch-Verfahren".

2.2.3.4.1 Adsorption der Catecholamine an Kationenaustauscher

Die Kationenaustauscherharze verschiedener Firmen wurden nach 3 verschiedenen Methoden

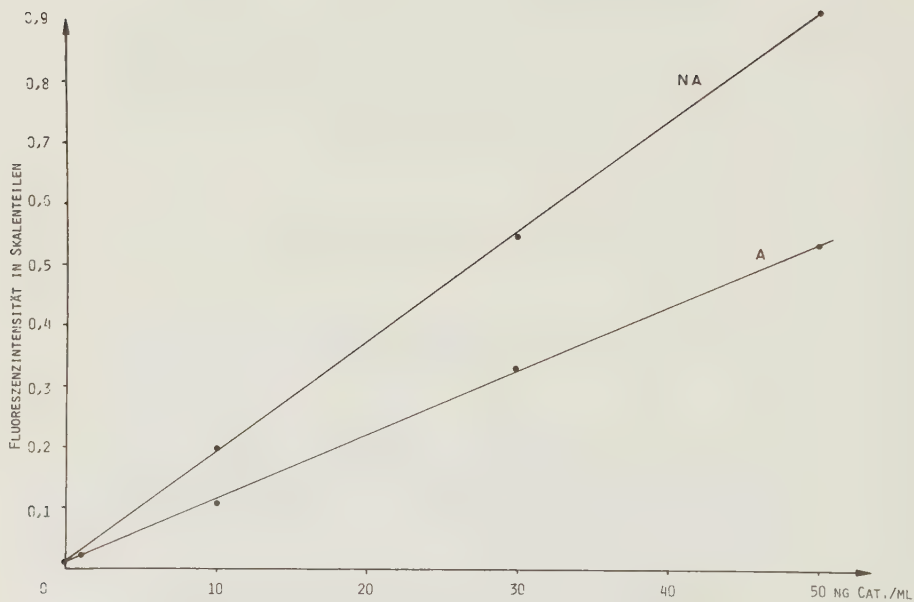


Abbildung 22:

Eichkurven für Adrenalin- und Noradrenalin-
Standardlösungen

konditioniert, welche in Kap. 5.2, S.214 genau aufgeführt sind.

Die Kunststoffssäulen der Fa. DIA-LAB wurden jeweils bis zu einer Höhe von 41 mm bei einem Innendurchmesser von 8 mm mit Harz gefüllt.

Die Adsorptions- und Desorptionsraten der verschiedenen konditionierten Ionenaustauscher haben wir durch den Zusatz definierter Mengen an 14-C-Adrenalin gemessen. Die eingesetzte Radioaktivitätsmenge betrug jeweils 5.350.000 cpm. Um Oxidationsvorgänge und Wandreaktionen vernachlässigen zu können, wurde das 14-C markierte Adrenalin mit unmarkiertem Adrenalin versetzt. Der Analysengang ist in Kap. 5.2, S. 216 nachzuschlagen.

In Tabelle 4 findet sich eine Zusammenstellung der verwendeten Harze, aufgegliedert nach den unterschiedlichen Konditionierungsarten. Dazu sind die Zählausbeuten für die Eluate in cpm und in Prozent, bezogen auf die eingesetzte Menge von 5.350.000 cpm = 100%, aufgeführt.

Die besten Ergebnisse erbrachten Amberlite CG 50 I (Konditionierungsart 1 = K1) und die BIO-REX 70 Harze mit den Mesh-Zahlen 50/100 (K);

Ionenaustauscher- harz	Durchlaufzeit der Probe in Minuten	Konditionierungsart		Konditionierungsart	
		1	2	3	1 2 3
		Zählausbeute in cpm (MW)	Zählausbeute in cpm (MW)	Zählausbeute in % der ein- gesetzten cpm (MW)	
Amberlite AG/RC50 50 mesh	1	8150,5	4121,7	28387,1	8,62 4,36 30,02
Amberlite CG 50 I 100/200 mesh	10	40441,3	13369,3	62244,3	42,75 14,15 65,85
Dowex 50Wx8 50/100 mesh	4	95,3	79,3	260,3	0,10 0,08 0,28
Dowex 50Wx8 100/200 mesh	25	126,3	84,9	126,2	0,14 0,09 0,14
BITO-REX 70 20/50 mesh	1 - 2	28565,0	4803,3	25630	30,25 5,08 27,10
BITO-REX 70 50/100 mesh	5 - 10	61455,9	12873,4	62006,3	65,0 13,60 65,55
BITO-REX 70 100/200 mesh	35	53755,6	35202,7	56106,8	56,85 37,25 59,35
BITO-REX 70 200/400 mesh	50 - 70	47318,9	28250,6	54357,0	50,05 29,85 57,50
MERCK 5 1080 60/150 mesh	15 - 30	195,3	84,3	174,7	0,21 0,09 0,19
BITO-RAD Fertigsäulen ca. 50/100mesh sphärisch	6	56844,7			60,10

Tab.4: Zählausbeuten von 14-C-Adrenalin verschiedener Ionenaustauscherharze bei unterschiedlichen Konditionierungsarten

50/100 (K 3); 100/200 (K 1) und 100/200 (K 3). Diese Harze und Fertigsäulen der Firma BIO-RAD, München, wurden für die weiteren Versuche verwendet.

2.2.3.4.2 Adsorption der Catecholamine an Aluminiumoxid

In Versuchen testeten wir neutrales, saures und basisches Aluminiumoxid der Aktivitätsstufe I. Diese handelsüblichen Aluminiumoxide mußten vor dem Einsatz zunächst einmal von Abriebteilchen befreit und dann oberflächenaktiviert werden. Die Vorbehandlung wurde nach dem von ANTON u. SAYRE (1962) beschriebenen Verfahren vorgenommen.

Das solchermaßen vorbereitete Aluminiumoxid versetzten wir zur Adsorption mit einer 14-C-Adrenalinlösung von 536.000 cpm. Adsorption, Desorption und Messung der resultierenden Radioaktivität wurden wie in Kap. 5.2, S. 217 beschrieben, vorgenommen.

Die Rückrechnung auf das Gesamteluat ergab für das Aluminiumoxid neutral eine Zerfallrate von 321.000 cpm, für Aluminiumoxid alkalisch 349.000 cpm und Aluminiumoxid sauer 391.000 cpm. Daraus errechneten sich beim Vergleich mit der Ausgangsaktivität Wiederauffindungsraten von

59,5; 65,1 und 72,9%. Für die weiteren Versuche wurde das saure Aluminiumoxid verwendet.

2.2.3.5 Erstellung von Catecholamin-Additionskurven auf Urinbasis

Ziel der folgenden Untersuchungen war es, das geeignete Adsorptionsmittel herauszufinden. Aufgrund der Vorversuche wurden bei den Ionenaustauscherharzen die Fertigsäulen der Firma BIO-RAD und das BIO-REX 70 mit dem sauren Aluminiumoxid verglichen. Diese Adsorptionsmittel setzten wir zur Erstellung von Catecholamin-Additionseichkurven auf Urinbasis ein. Als Auswahlkriterien wurde eine möglichst große Steigung der Eichgeraden bei niedrigen Leerwerten gefordert.

2.2.3.5.1 Urin-Catecholaminanalysen über Ionenaustauscherchromatographie

Mit den ausgewählten Harztypen (vgl. Kap. 2.2.3.4.1) wurde ein Normalurinpool und der höchste Eichpunkt mit einem Adrenalinzusatz von 100 µg/l bzw. 200 µg Noradrenalin/l untersucht. Die Adrenalin- und Noradrenalinadditionen erfolgten zu getrennten Urinproben. Die Analysen

wurden als Doppelbestimmungen ausgeführt. Für jeden Ansatz waren entsprechend der Bestimmungsmethode 5 ml Urin notwendig (BIO-RAD Lab. 1977). In der Tabelle 5 werden die Ergebnisse dieser Untersuchungen und eine Zusammenstellung der Steigungen der Eichgeraden gezeigt.

Die besten Resultate wurden mit der Fertigsäule BIO-RAD Lab. und dem Ionenaustauscher BIO-REX 70 50/100 Mesh, konditioniert mit Phosphatpuffer, erzielt. Additionseichkurven mit Adrenalinzusätzen von 0; 20; 40; 60; 80; 100 µg/l und Noradrenalinadditionen von 0; 40; 80; 120; 160 und 200 µg/l für die beiden Harze sind in Abbildung 23 wiedergegeben.

Mit beiden Austauscherharzen haben wir 27 Urinproben auf ihren Adrenalin- und Noradrenalin-gehalt analysiert. Die Korrelationskoeffizienten zeigten für Noradrenalin mit $r = 0,98$ eine gute und für Adrenalin mit $r = 0,87$ eine weniger gute Übereinstimmung der zwei Verfahren. Die dazugehörigen Korrelationsdiagramme sind in Abbildung 24 und 25 zu sehen.

Substanz		Adrenalin			Noradrenalin		
Harz	Konditionsierungsart	Addition 0 in Skt.	Addition 100µg/l in Skt.	Eichgeradensteigung in Grad	Addition 0 in Skt.	Addition 200µg/l in Skt.	Eichgeradensteigung in Grad
Amberlite CG 50 I	3	0,16	0,97	22,2	0,46	2,10	23,0
Bio-Rex 70 50/100	1	0,17	1,00	23,2	0,50	2,56	27,7
Bio-Rex 70 100/200	1	0,16	0,90	20,0	0,35	1,72	19,0
Bio-Rex 70 50/100	3	0,18	0,96	21,6	0,40	2,01	22,0
Bio-Rex 70 100/200	3	0,15	0,90	21,0	0,38	2,00	23,0
Bio-Rad Fertigsäule		0,10	1,00	35,5	0,20	2,40	29,0

Tab. 5: Zusammenstellung der Fluoreszenzausbeuten von Adrenalin- und Noradrenalinzusätzen zu Poolurin unter Benutzung verschiedener Ionenaustauscherharze

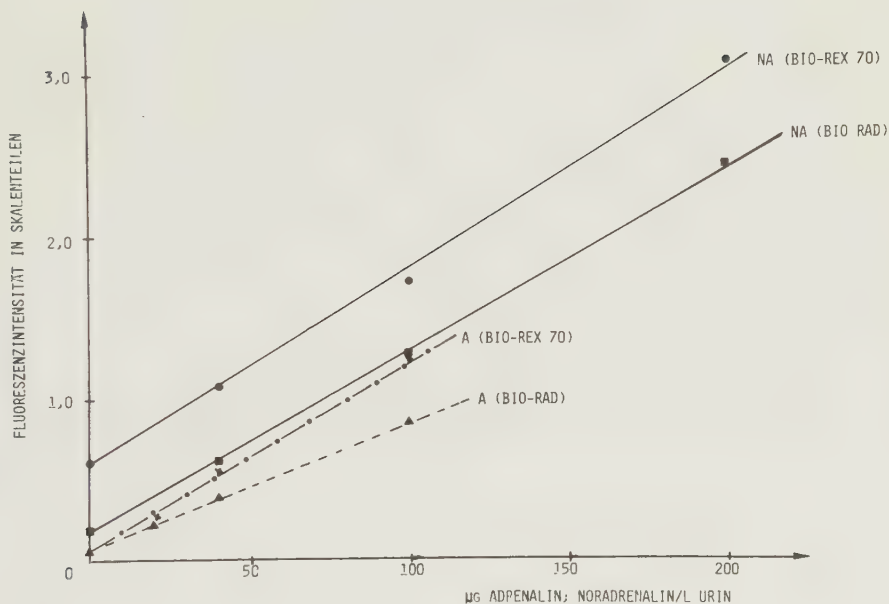


Abbildung 23:
Additionseichkurven auf Urinbasis, erstellt mit
den Ionenaustauscherharzen Bio-Rex 70 und
Bio-Rad

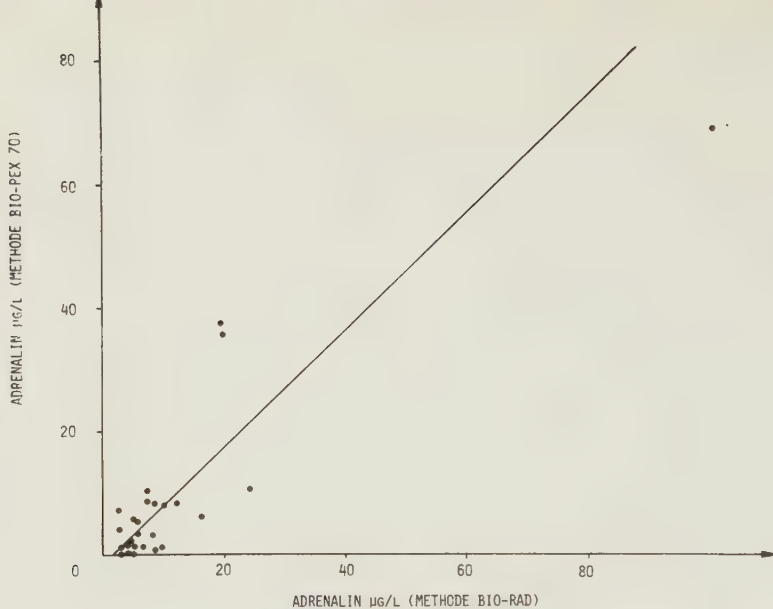


Abbildung 24:

Korrelationsdiagramm der AdrenalinKonzentration in 27 Urinen für die zwei Ionenaustauscherharze Bio-Rex 70 (50/100 mesh) und Bio-Rad ($y=0,95x-3,1$)

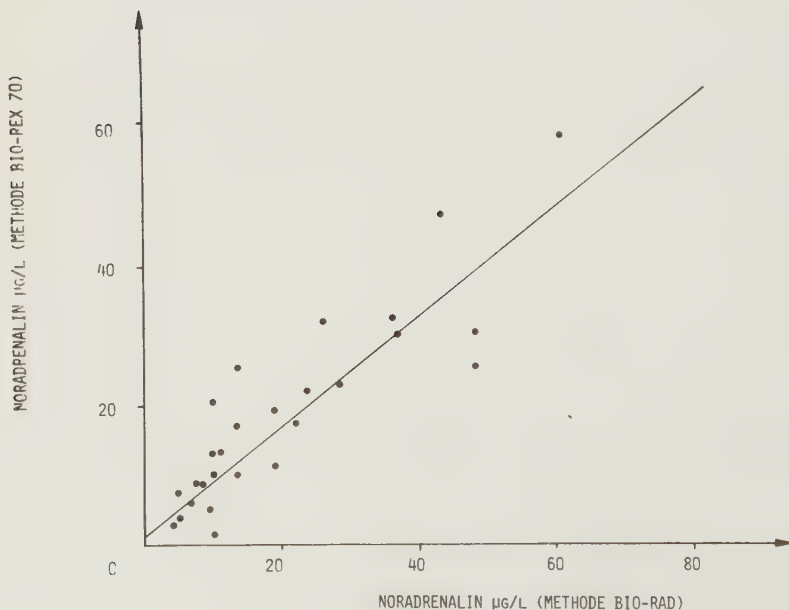


Abbildung 25:

Korrelationsdiagramm der NoradrenalinKonzentration in 27 Urinen für die zwei Ionenaustauscherharze Bio-Rex 70 (50/100 mesh) und Bio-Rad ($y=0,78x+4$)

2.2.3.5.2 Urin-Catecholaminanalysen über Adsorptionschromatographie an Aluminiumoxid

Entsprechend den in Kap. 2.2.3.3.1 beschriebenen Versuchsbedingungen wurden Eichkurven mit Urinmatrix untersucht. Zu Normalurin erfolgten sowohl Adrenalin- als auch Noradrenalinzusätze (Arbeitsvorschrift vgl. Kap. 5.2, S. 218). Daraus resultierten folgende Eichkonzentrationen:

Adrenalin:	0; 40; 60; 80; 100 µg/l
Noradrenalin:	0; 80; 120; 160; 200 µg/l

Die so erhaltenen Additionseichkurven auf Urinbasis für Adrenalin und Noradrenalin sind in Abbildung 26 dargestellt.

2.2.3.6 Analytische Zuverlässigkeitskriterien der Verfahren

Die Präzision in der Serie wurde von uns im Normalbereich und für pathologische Konzentrationen geprüft. Die Messungen erfolgten sowohl bei Normalurin als auch bei Urin mit Catecholaminzusatz. Die Urinproben wurden jeweils 6mal mit dem Verfahren Ionenaustauscherharz mit an-

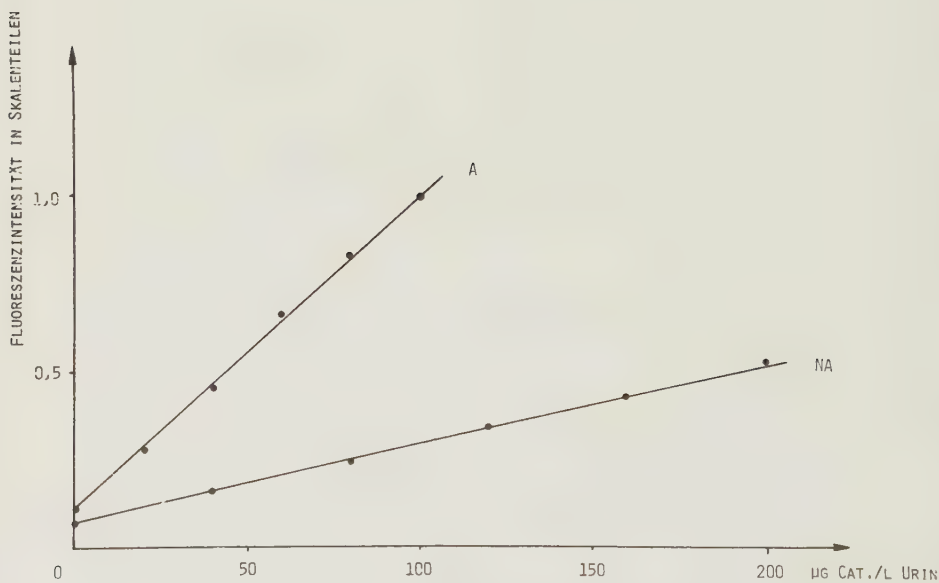


Abbildung 26:
Additionseichkurven für Adrenalin und Noradrenalin im Urin

schließender Kaliumhexacyanoferrat (III)-Oxidation (vgl. Kap. 2.2.3.3.2) bzw. mit der Kombination Aluminiumoxid sauer und Jodoxidation (vgl. Kap. 2.2.3.3.1) analysiert. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 6 zusammengestellt. Die Präzision wurde als Pearson'scher Variabilitätskoeffizient berechnet. Daneben sind noch die gemessenen Catecholaminkonzentrationen aufgeführt. Die gefundenen Variationskoeffizienten können als gut bezeichnet werden. Der etwas höhere Variationskoeffizient von 14,7 bzw. 19,8% für Adrenalin ist durch den niedrigen normalen Adrenalinspiegel im Urin bedingt.

Die Richtigkeit der Analysenmethoden wurde durch Wiederauffindungsversuche geprüft. Bei Zusatz von 400 µg Noradrenalin/l Normalurin ergab sich eine mittlere Wiederauffindungsrate von 85%. Der Zusatz von 200 µg Adrenalin/l Urin erbrachte sogar Wiederauffindungsraten von 99%. Die Nachweisgrenzen für das Ionenaustauscherverfahren lagen bei ca. 1 µg Catecholamin/l Urin, für das "Batch-Verfahren" bei ca. 5 µg Catecholamin/l Urin.

Zur Überprüfung der Spezifität der Verfahren wurde ein direkter Vergleich der beiden Analysenmethoden vorgenommen. Die Parallelanalyse erfolgte mit 10 Normalurinproben. Die Analysenergebnisse zeigten, daß die Kombination Aluminiumoxid mit der Jodoxidation zu höheren Catecholaminwerten führt.

	Adrenalin	Noradrenalin
Konzentration ($\mu\text{g/l}$)	6	15
Variationskoeffizient in % ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ -Oxid.)	14,7	5,4
Variationskoeffizient in % (J_2 -Oxid.)	19,8	11,2
Konzentration ($\mu\text{g/l}$)	400	800
Variationskoeffizient in % ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ -Oxid.)	5,2	8,0
Variationskoeffizient in % (J_2 -Oxid.)	8,1	10,3

Tabelle 6:
Die Werte für die Präzision in der Serie für das Ionenaustauschverfahren ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ -Oxidation) und das Aluminiumoxidverfahren (J_2 -Oxidation)

Wir bewerten dies im Sinne der Messung eines unspezifischen Anteils. Die Spezifität ist somit bei der Verwendung von Ionenaustauscherharzen in Verbindung mit der Kaliumhexacyanoferrat (III)-Oxidation am besten.

2.2.4 Diskussion

Unsere umfangreichen experimentellen Untersuchungen zeigten, daß sowohl bestimmte Ionenaustauscherharze als auch saures Aluminiumoxid für eine quantitative Abtrennung der Catecholamine vom biologischen Material geeignet sind. Bei Kombination mit einem geeigneten Oxidationsverfahren läßt sich dann relativ unproblematisch die quantitative fluorimetrische Bestimmung der Catecholamine Adrenalin und Noradrenalin durchführen. Die analytischen Zuverlässigkeitskriterien der Präzision und der Richtigkeit sind durchwegs als gut zu bezeichnen. Dagegen hat die Prüfung der Spezifität gezeigt, daß bei der Anwendung der Kombination von Aluminiumoxid sauer und Jodoxidation unspezifische Anteile bei der fluorimetrischen Endpunktbestimmung vorhanden sind. Wir geben daher dem Einsatz von Ionenaustauscherharz in Verbindung mit einer Kaliumhexacyanoferrat (III)-Oxidation den Vorzug.

Insbesondere aus den erzielten Daten über die analytischen Nachweisgrenzen der Verfahren konnten

wichtige Hinweise für die quantitative Bestimmung der Catecholamine im biologischen Material erhalten werden. Das eigentliche Ergebnis unserer Versuche besteht darin, daß sich die spektralfluorimetrische Bestimmung der Normal-Plasma-Catecholaminspiegel im Bereich der analytischen Nachweisgrenze bewegt. Dies gilt für die beiden beschriebenen Methoden. Nach unseren Erfahrungen stehen bei arbeitsmedizinischen Fragestellungen für die Analyse nur maximal 2 ml Blutplasma zur Verfügung. In diesen relativ geringen Probenmengen lassen sich aufgrund unserer Ergebnisse und gezielter Literaturrecherchen zuverlässige quantitative Bestimmungen der Plasma-Catecholamine mit der Spektralfluorimetrie nicht durchführen.

Im Gegensatz zur Plasmaanalyse erwies sich die Spektralfluorimetrie als ein analytisch zuverlässiges und praktikables Verfahren für die Bestimmung der Catecholamine im Harn. Durch geringfügige Modifikationen lassen sich die Catecholamine Adrenalin und Noradrenalin fraktioniert bestimmen.

Aus analytischer Sicht halten wir die Kombination Ionenaustauscherchromatographie und Kaliumhexacyanoferrat (III)-Oxidation für am geeignetsten. Diese Methode liefert zum einen durchwegs höhere Fluoreszenzausbeuten bei gleichgroßen Leerwerten,

zum anderen ist der Anteil unspezifischer Fluoreszenz am geringsten.

2.3 Der radiochemische Nachweis der Plasma-Catecholamine

2.3.1 Einleitung

ENGELMAN et al. beschrieben 1968 eine Doppel-isotopen-Derivatisierungsmethode für die Bestimmung der Gesamt-Catecholamine (d.h. der Summe aus Adrenalin und Noradrenalin) im Plasma. 1970 erweiterten die Autoren dieses Verfahren durch den Einbau eines dünnschichtchromatographischen Trennschrittes zu einer Methode für die fraktionierte Bestimmung von Adrenalin und Noradrenalin.

Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, daß die Catecholamine mit ^{14}C -markiertem S-Adenosyl-methionin unter Katalyse von Catechol-Sauerstoff-Methyltransferase (COMT) enzymatisch in das ^{14}C -Metanephrin und das ^{14}C -Normetanephrin überführt werden. Zur Kompensation der Verluste während der chemischen Aufarbeitung werden tritiummarkiertes Adrenalin und Noradrenalin als interne Standards dem Analysenmaterial zugesetzt. Die gebildeten Metanephrine trennt man dünnschichtchromatographisch, eluiert sie vom

Kieselgel und oxidiert mit Natriummetaperjodat zu Vanillin bzw. Isovanillin. Diese Substanzen werden durch Extraktion mit Toluol isoliert. Die Messung der $^{14}\text{-C}/^3\text{H}$ -Aktivität in verschiedenen Meßkanälen erfolgt mit einem Flüssigkeits-Szintillationsspektrometer.

Die Vorteile dieses Verfahrens bestehen darin, daß:

1. Durch die Mitführung interner, tritiummarkierter Standards Absolutwerte bestimmt werden können.
2. Die Methode eine hohe Empfindlichkeit besitzt, welche direkt abhängig von der spezifischen Aktivität des markierten Reagenz und den Leerwerten ist.

Nachteilig ist die große Anzahl von Trennschritten und das mehrmalige Lyophilisieren (WISSENER u. KNOLL 1973). Dies bedingt auch einen großen Zeit- und Arbeitsaufwand für eine Analyse. Mit dem Verfahren können von einer Person maximal bis zu 10 Blutproben pro Woche untersucht werden.

Weiterhin schränkt der Bedarf von 10 ml Plasma pro Analyse die Einsatzmöglichkeiten dieser Technik für die Praxis ein. Bei Untersuchungen,

die sich mit der Quantifizierung von Stress-Abläufen befassen, ist es unserer Meinung nach nicht möglich, derartige Blutmengen kontinuierlich zu entnehmen. Eine mehrmalige Gewinnung großer Blutvolumina wirkt sich direkt auf den Plasma-Catecholaminspiegel aus.

Eine geringfügige Modifikation dieser Originalmethode wurde 1973 von CHRISTENSEN veröffentlicht. Man vereinfachte zwar einige Reaktionsschritte, jedoch ist die Methode nach wie vor äußerst zeitaufwendig.

Mittlerweile haben sich eine Vielzahl von Autoren mit dem radiochemischen Nachweis der Plasma-Catecholamine befaßt. Ohne Anspruch auf Vollständigkeit seien unter Einbeziehung neuerer Veröffentlichungen die Arbeiten von SIGGERS et al. (1970), PASSON u. PEULER (1973), ROIZEN et al. (1974), HENRY et al. (1975), da PRADA u. ZÜRCHER (1976) BEN-JONATHAN u. PORTER (1976), de CHAMPLAIN u. FARLEY (1976), SOLE u. HUSSAIN (1977), ERIKSSON et al. (1977), MÜLLER (1977 u. 1978) und WISSER et al. (1979) erwähnt.

Die von PASSON u. PEULER (1973) publizierte Arbeitsvorschrift erschien uns zunächst für die radiochemische Plasma-Catecholaminbestimmung am besten geeignet. Der Vorteil dieses Verfahrens

liegt im direkten Einsatz von Plasma-Proben ohne vorhergehende Vorbereitung derselben. Wir haben dieses Verfahren für unsere Zwecke variiert und zunächst zur Bestimmung der Gesamt-Catecholamine benutzt (VALENTIN et al. 1977).

Am Beispiel dieser Bestimmungsmethode haben wir eine gründliche Untersuchung der einzelnen Reaktions- und Aufarbeitungsschritte durchgeführt. Außerdem fanden auch ausführliche Studien über das Methylierungsenzym COMT statt.

Durch den Einbau chromatographischer Trennschritte konnten wir dann Versuche zur differentiellen Analyse von Adrenalin und Noradrenalin im Blutplasma vornehmen. Das hierzu beschriebene Verfahren war jedoch, wie die Untersuchungen zeigten, mit hohem Arbeitsaufwand und niedriger analytischer Zuverlässigkeit behaftet.

In einer weiteren Studie versuchten wir, eine von COYLE u. HENRY (1973) beschriebene radiochemische Methode zur Bestimmung von Noradrenalin und Dopamin im Hirngewebe auf das Untersuchungsmaterial Plasma zu adaptieren. Besonderen Wert legten wir bei dieser Methodenentwicklung auf die Optimierung der Inkubationsbedingungen, der Puffer, der pH-Werte und der Ionenstärke des Cosubstrates.

Zunächst wurde eine Methode zur Bestimmung der Gesamt-Catecholamine erarbeitet. Da bei diesem Verfahren nur Extraktions-, aber keine Einengungsschritte notwendig sind, kann besonders zeitsparend gearbeitet werden. Entsprechende Versuche, das Verfahren auch auf die differentielle Analyse der Plasma-Catecholamine anzuwenden, folgten.

Die genannten radiochemischen Verfahren sind relativ zeitaufwendig. Für bestimmte arbeitsmedizinische Fragestellungen - z.B. der Objektivierung und Quantifizierung physischer Belastungen - ist oftmals die alleinige Analyse des Plasma-Noradrenalins ausreichend. Wir haben daher zusätzlich eine einfache und schnell auszuführende radiochemische Bestimmungsmethode des Noradrenalin-Plasmaspiegels geprüft (HENRY et al. 1975). Dieses Verfahren wurde durch den Einsatz von ¹⁴C-markiertem Adrenalin zu einer Doppelisotopenverdünnungsanalyse erweitert. Die analytische Zuverlässigkeit konnte dadurch bedeutend verbessert werden (SCHIELE et al. 1978). Die wesentlichen experimentellen Ergebnisse zur Prüfung und Optimierung wichtiger in der Literatur beschriebener radiochemischer Methoden zur Erfassung der Plasma-Catecholamine werden im folgenden vorgestellt.

2.3.2 Prinzip der Verfahren

Die Radioreagenz-Methoden zur quantitativen Bestimmung der Gesamt-Catecholamine bzw. zur differentiellen Analyse von Adrenalin und Noradrenalin basieren auf der Umwandlung von Adrenalin und Noradrenalin unter enzymatischer Mitwirkung des Enzyms Catechol-O-Methyltransferase zu den Methylethern der Catecholamine. Dies gilt sowohl für den Ansatz nach PASSON u. PEULER (1973) als auch nach COYLE u. HENRY (1973).

Als Methylgruppendonor dient bei dieser Reaktion S-Adenosyl-L-Methionin (SAM). Die Reaktionsgleichung ist am Beispiel des Adrenalins dem Formelschema in Abbildung 27 zu entnehmen.

Die übertragene Methylgruppe ist tritiummarkiert. Durch selektive Extraktion werden die entstandenen Methylether der Catecholamine aus dem alkalischen Medium isoliert und das Radioreagenz 3-H-SAM möglichst vollständig entfernt.

Für die differentielle Analyse von Adrenalin und Noradrenalin erfolgt meist eine dünnschichtchromatographische Auftrennung. Die weitere Aufarbeitung der ammoniakalischen Extrakte entspricht dem Vorgehen zur Bestimmung der Catecholamine. Zunächst werden die Metanephrine mit Natriumperjodatlösung zu Vanillin oxidiert. Zur

Reinigung des tritiummarkierten Vanillins von störenden Substanzen erfolgen anschließend mehrere Extraktionsschritte. Das weitere Vorgehen basiert auf dem chemischen Verhalten des Vanillins. Dieses ist als Ammoniumsalz schlecht in organische Lösungsmittel zu extrahieren, wohingegen es im Säuren als freies Phenol vorliegt und deshalb die organische Phase bevorzugt. Die am Ende der Aufarbeitungsschritte erhaltene organische Phase wird mit Szintillationsflüssigkeit versetzt und die Radioaktivität des tritiummarkierten Vanillins im Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen. Die Zählraten entsprechen hierbei direkt der ursprünglich vorhandenen Catecholamin-Konzentration. Die Auswertung erfolgt durch Vergleich der Zählwerte mit erstellten Eichkurven.

Bei dem Verfahren zur alleinigen Bestimmung von Noradrenalin im Plasma wird die Substanz unter katalytischer Mitwirkung des Enzyms Phenylethanolamin-N-Methyltransferase (PNMT) mit einer tritiummarkierten Methylgruppe aus SAM in tritiummarkiertes Adrenalin umgewandelt (Abb. 28). Als interner Standard wird jeder Probe nach der Inkubation eine definierte Menge 14-C-Adrenalin zugesetzt. Die Abtrennung des markierten Adrenalins aus dem Reaktionsgemisch erfolgt durch Adsorption am Aluminiumoxid. Nach mehreren Extraktions- und Reinigungsschritten werden die Proben im Szintillations-

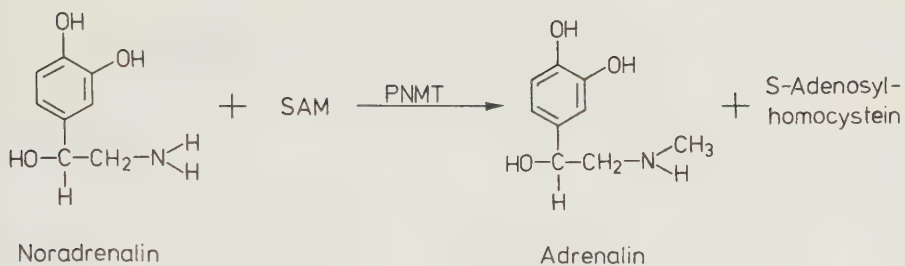


Abbildung 28:
 Formelschema für die PNMT-katalysierte Radio-
 markierung von Noradrenalin

zähler gezählt. Die quantitative Auswertung wird über Eichkurven wie bei einer Doppelisotopenanalyse vorgenommen.

2.3.3 Die analytische Bestimmung der Gesamt-
Catecholamine im Plasma
(VALENTIN et al. 1977)

2.3.3.1 Geräte, Chemikalien und Lösungen

vgl. Kap. 5.3.1, S. 219

2.3.3.2 Probennahme und Probenlagerung

vgl. Kap. 5.3.1, S. 224

2.3.3.3 Arbeitsvorschrift

vgl. Kap. 5.3.1, S. 225

2.3.3.4 Eichung

Es ist notwendig, für jeden Ansatz eine Eichkurve zu erstellen. Ursachen dafür sind zum einen die Instabilität der COMT-Präparation, die auch bei Lagerung unterhalb von -20°C langsam an Aktivität verliert, zum anderen aber auch die Vielzahl der eingesetzten Reagenzien und

Lösungsmittel. Speziell die markierten Substanzen können, wie unsere Untersuchungen ergaben, von einer zur anderen Handelscharge variieren. Bisher ist es uns nicht gelungen, diesen reagenzienbedingten Faktor zu eliminieren. Die gleiche Situation besteht bei einer Vielzahl von radiochemischen Methoden, wie z.B. bei allen Radioimmunoassays.

Zur Bestimmung der Gesamt-Catecholamine haben wir Eichkurven im Bereich von 0 bis 300 pg Catecholamin erstellt. Wie orientierende Analysen zeigten, ist dieser Meßbereich beim Einsatz von 100 µl Plasma in den meisten Fällen ausreichend. Die gewonnene Eichkurve ist über den angegebenen Bereich linear (Abb. 29).

2.3.3.5 Analytische Zuverlässigkeitskriterien der Methode

Die Präzision in der Serie wurde durch 8fach-Messung eines Plasmas bestimmt. Bei einem Mittelwert von 29,24 nM Catecholamin (CA)/1 Plasma ergab sich ein Variationskoeffizient von 11,6%.

Zur Überprüfung der Richtigkeit setzten wir einem Plasma, welches 25 pg CA/200 µl Plasma (entsprechend 3,72 pM CA/l) enthielt, 100 pg Adrenalin

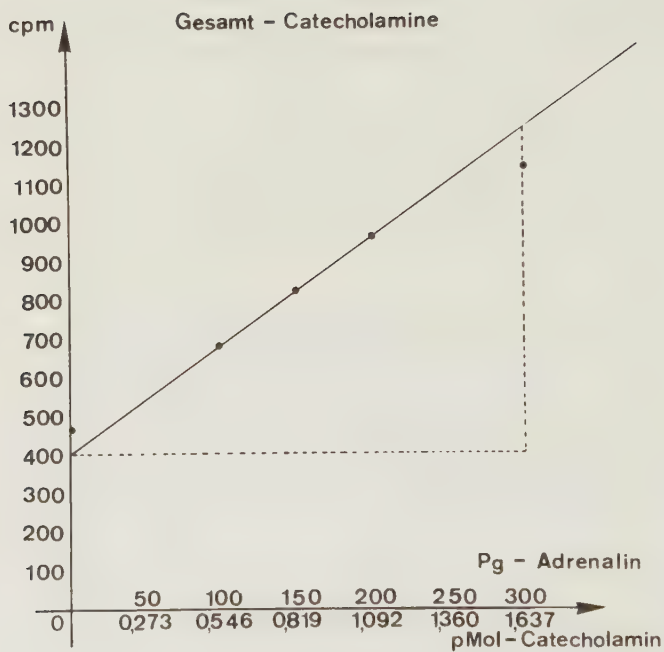


Abbildung 29:
Eichkurve zur Bestimmung der Gesamt-Catechol-
amine

zu. Bei der Analyse dieser Probe wurden 157 pg CA/200 µl Plasma gemessen. Dies entspricht einer Wiederauffindungsrate von 132%. Als Nachweisgrenze ermittelten wir 50 pg Catecholamin/ml Plasma.

Der zeitliche Aufwand für 8 Plasmaanalysen, jeweils als Doppelbestimmung, liegt für eine Person bei einem Arbeitstag. Diese relativ hohe Analysenfrequenz ist durch den Einsatz automatischer Pipettierhilfen und einer Optimierung der einzelnen Analysenschritte möglich geworden.

2.3.3.6 Untersuchungen der Catechol-O-Methyltransferase-Präparation

Für die Qualität der beschriebenen Analyse-methode ist die verwendete Enzympräparation von großer Bedeutung. Wir haben deshalb in jeder Enzympräparation deren Eiweißgehalt und deren Enzymaktivität bestimmt. Weitere Einflußfaktoren wurden geprüft.

Eine Charge einer COMT-Präparation mit 9,3 U/l wurde säulenchromatographisch über DEAE-Cellulose gereinigt und mit einem Fraktionensammler portioniert. Die Versuchsbedingungen sind aus Kap. 5.3.1, S. 228 zu entnehmen.

Der Proteingehalt der Eluate wurde mit einer Durchflußküvette bei einer Wellenlänge von 254 nm gemessen (Abb. 30). Zusätzlich hatten wir die Fraktionen 15 - 31 (je 10 ml) auf ihre COMT-Aktivität untersucht (Abb. 31).

Die Eiweißbestimmung erfolgte nach AMELUNXEN (1951). Wir ermittelten für die verschiedenen COMT-Präparationen einen durchschnittlichen Eiweißgehalt von 20 bis 30 mg/ml Enzympräparation. Von dieser Präparation setzt man erfahrungsgemäß eine 2 bis 3 mg Protein enthaltende Menge/Inkubationsansatz ein.

Die Bestimmung der COMT-Aktivität wurde nach GRIFFITHS u. LINKLATER (1972) in einer Modifikation von GOSSLER u. SCHALLER (1975) vorgenommen.

Im einzelnen wurden hierfür 100 µl der COMT-Präparation mit 400 µl Wasser verdünnt und diese Menge in den Ansatz eingebracht. Die Enzymaktivitätsbestimmung ergab für verschiedene Präparationen Werte zwischen 12 und 16 U/l. Dabei ist eine Einheit (U) die Aktivität des Enzyms, welche pro Minute die O-Methylierung von 1 mMol Adrenalin unter den angegebenen Reaktionsbedingungen katalysiert.



Abbildung 30:
Elutionsdiagramm für den Proteingehalt bei der
säulenchromatographischen COMT-Präparation, ge-
messen bei 254 nm

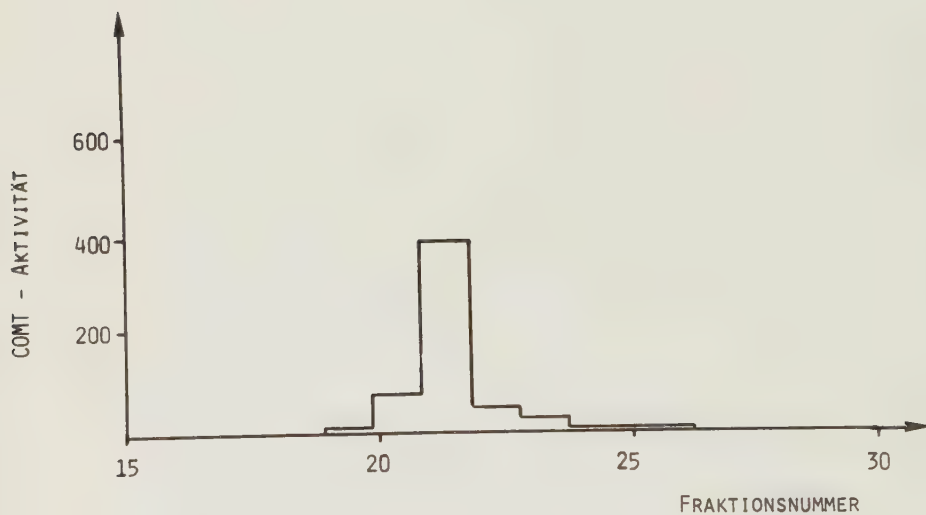


Abbildung 31:
Zusammenhang zwischen Fraktionsnummer und
COMT-Aktivität

Weiterhin haben wir die Stabilität des Enzyms in Abhängigkeit von der Zeit zwischen dem Auftauen der Präparate und deren Verwendungsbeginn überprüft. Die Aktivität einer COMT-Präparation (1:200 verdünnt, eingesetzte Menge 100 μ l) wurde 0,5; 10; 20; 30 und 40 Minuten nach dem Auftauen bestimmt. Die ermittelten Aktivitätseinheiten von 170, 180, 190, 204, 201 und $172 \cdot 10^{-4}$ U/l zeigten keine signifikanten Variationen.

Zur Prüfung der Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Reaktionstemperatur inkubierten wir die Reaktionsansätze bei 25, 30, 37 und 45°C. Wie aus der folgenden Abbildung 32 ersichtlich ist, steigt die Enzymaktivität in diesem Temperaturbereich linear an.

Um eine Verringerung von Oxidationsreaktionen zu erreichen, gibt man zu den Blutproben bei der Probennahme und in die Inkubationsansätze Reduktionsmittel. Diese müssen so beschaffen sein, daß keine Beeinträchtigung der Methylierungsreaktion stattfindet. Bei Inkubationsansätzen mit den üblichen GSH-Konzentrationen (ca. 5 nM) ergab sich keine Hemmung der Methylierungsreaktion. Bei einem Versuch mit der 4fachen angegebenen Konzentration erhielten wir 12.730 cpm im Vergleich zu 14.666 cpm. Dies entsprach einer Reaktionshemmung von nur 13,2%.

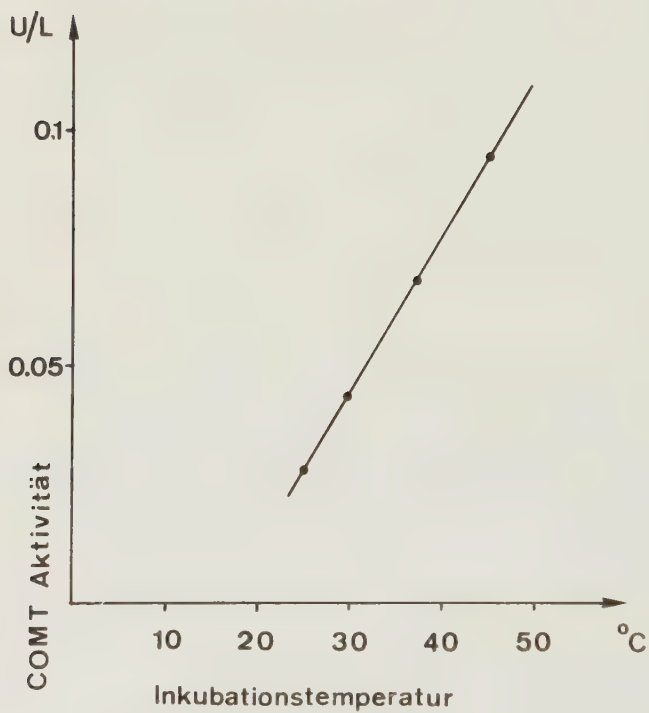


Abbildung 32:

Zusammenhang zwischen COMT-Aktivität und Inkubationstemperatur

Erst GSH-Mengen von 11.5 mg/Ansatz (100facher Überschuß) bewirkten eine Reduzierung der Methylierungsrate von 9.600 auf 2.200 cpm (Abfall um 67,1%).

Als Puffersystem für den Inkubationsansatz kommen vor allem Phosphat- (ENGELMAN 1968 und 1970) und Tris-hydroxymethyl-aminomethan-Puffer (PASSON u. PEULER 1973, COYLE u. HENRY 1973) infrage. Es wird angegeben, daß im Tris-Puffer 10 bis 25% mehr Adrenalin methyliert werden als im Phosphatpuffer. Wir konnten dies bestätigen. Bei der Analyse von 10 Plasmaproben erreichten wir eine Erhöhung der mittleren Zählausbeute um 17% mit einem Tris-Puffer.

Als einer der bedeutendsten Faktoren für die Empfindlichkeit des Meßverfahrens gilt die spezifische Aktivität des eingesetzten 3-H-SAM.

Wir verwendeten 2,5 μCi 3-H-SAM mit einer spezifischen Aktivität von 240 $\mu\text{Ci}/\text{mMol}$ für jeden Ansatz. Man erhält damit aufgrund theoretischer Berechnungen 3 dpm/pg Catecholamin. Dies ergibt für die Plasma-Catecholaminbestimmung im Normbereich eine rechnerische cpm-Ausbeute von ca. 500.

In späteren Versuchen haben wir die Zählausbeute durch den Einsatz von 3-H-SAM erhöhter spezifi-

scher Aktivität (11,6 Ci/mMol) verbessert. Gegenüber dem früher verwendeten 3-H-SAM (240 μ Ci/mMol) mit 3 cpm/pg Catecholamin liegt die theoretische Zählausbeute jetzt bei 145 dpm. Dementsprechend verlaufen die gewonnenen Eichkurven wesentlich steiler.

2.3.3.7 Untersuchungen zu den einzelnen Arbeitsschritten des Analysenganges

Die arbeits- und zeitaufwendige Probenaufbereitung bei den vorgestellten Methoden macht eine Überprüfung und Optimierung der verschiedenen Arbeitsschritte notwendig. Dies betrifft insbesondere die Einengung der organischen Phase am Rotationsverdampfer, die Vanillinoxidation und die Endpunktsbestimmung im Szintillationszähler. Weiterhin ist es möglich, durch Mitführen von 14 C-Adrenalin als Tracer den gesamten Analysengang auf Verluste bei der Aufarbeitung zu testen.

Zur Durchführung dieser Aufgaben wurde zunächst im präparativen Maßstab 3-H-Metanephrin und 3-H-Normetanephrin hergestellt (vgl. Kap. 5.3.1, S. 228)

Zur Überprüfung des Einengungsschrittes am Rotationsverdampfer wird die 3-H-Metanephrin-

präparation mit Wasser 1:8 verdünnt. 20 µl dieser Lösung gibt man zu einem Inkubationsansatz, der kein markiertes SAM enthält. Die Reaktion stoppt man mit Boratpuffer ab und die Extraktion wird wie üblich ausgeführt. Nach dem Einengen am Rotationsverdampfer überführt man den Rückstand quantitativ mit insgesamt 4,5 ml 2 M Ammoniak in Zählgläschen, die bereits 10 ml Szintillationslösung enthalten.

Führt man diesen Arbeitsschritt 8mal aus und vergleicht die Ergebnisse, so ergibt sich ein Variationskoeffizient von ca. 20%.

Die "Vanillinoxidation" wird ebenfalls durch markiertes 3-H-Metanephrin überprüft. Zu diesem Zwecke gibt man zu 4,5 ml 2 M Ammoniaklösung 20, 40, 60 und 100 µl einer 3-H-Metanephrin (3-H-Normetanephrin)-Lösung. 20 µl dieser Lösung enthalten 11.160 bzw. 17.950 cpm. Die weitere Aufarbeitung erfolgt wie üblich.

Wie Abbildung 33 zeigt, besteht zwischen eingesetzter und resultierender Radioaktivität ein linearer Zusammenhang. Die Wiederauffindungsrate für Metanephrin bzw. Normetanephrin beträgt 100,2 und 99,1%.

Die Endpunktsbestimmung im Szintillationszähler wird in erster Linie durch die Art des einge-

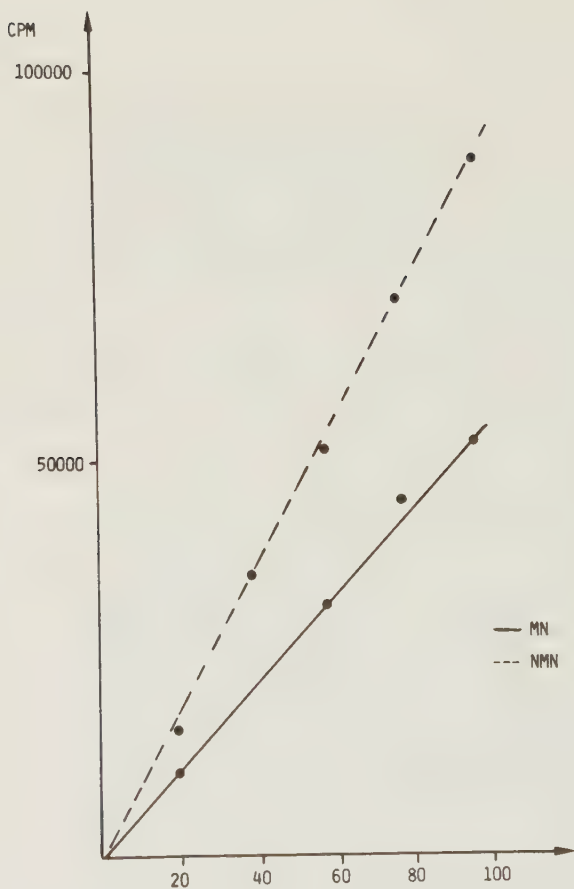


Abbildung 33:

Die Aufarbeitung von 3-H-Metanephrin und
3-H-Normetanephrin

setzten Szintillationscocktails beeinflusst. Wir haben die in der Flüssigkeitsszintillations-technik häufig verwendete Bray's Solution mit einer fertig hergestellten Mischung der Firma N.E.N., welche auf der Basis Toluol/Liquifluor beruht, verglichen. Diese Mischung ergibt eine um 30% verbesserte Zählausbeute.

Eine Überprüfung des gesamten Analysenganges kann durch die Zugabe von ^{14}C -Adrenalin zum Inkubationsansatz ohne gleichzeitige Verwendung des radioaktiv markierten SAM erfolgen. Das markierte Adrenalin wird hierbei als Tracer benutzt.

Die eingesetzten Mengen an ^{14}C -Adrenalin mit der spezifischen Aktivität von $58,9 \mu\text{Ci}/\text{mM}$ betragen 1; 10; 100 und 1000 ng/Ansatz. Vom Toluol/Isoamylextrakt werden $500 \mu\text{l}$ entnommen und mit 10 ml Bray's Solution für die ^{14}C -Messung in den Szintillationszähler gegeben.

Vom Toluolextrakt des letzten Extraktions-schrittes werden 15 ml abgehoben und mit $600 \mu\text{l}$ Liquifluor versetzt. Dann haben wir die Radioaktivität der Lösung gemessen. Für den Toluol/Isoamylalkohol-Extrakt errechnet sich eine Wiederauffindungsrate von 86%, für den Toluol-Extrakt von 63%.

Wir konnten mit beiden Extraktionsmedien über den gesamten Konzentrationsbereich Linearität erreichen. Die cpm-Werte des Toluol-Extraktes in Abhängigkeit von der eingesetzten 14-C-Adrenalinmenge sind in Abbildung 34 dargestellt.

2.3.4 Die fraktionierte quantitative Bestimmung von Adrenalin und Noradrenalin

2.3.4.1 Geräte, Chemikalien und Lösungen

vgl. Kap. 5.3.2, S. 230

2.3.4.2 Probennahme und Probenlagerung

Wie in Kapitel 5.3.1, S. 224

2.3.4.3 Arbeitsvorschrift

vgl. Kap. 5.3.2, S. 231

2.3.4.4 Eichung

Den Inkubationsansätzen werden definierte Mengen an Adrenalin und Noradrenalin zugesetzt.

Entsprechende Leerwerte werden ohne Catecholaminzusatz erstellt. Die erhaltenen Eichkurven für Noradrenalin sind bis 1.500 pg linear (Abb. 35). Dahingegen krümmt sich die Eichkurve



Abbildung 34:
Resultierende ^{14}C -Radioaktivität des Toluol-
extraktes in Abhängigkeit von der eingesetzten
Menge an ^{14}C -Adrenalin

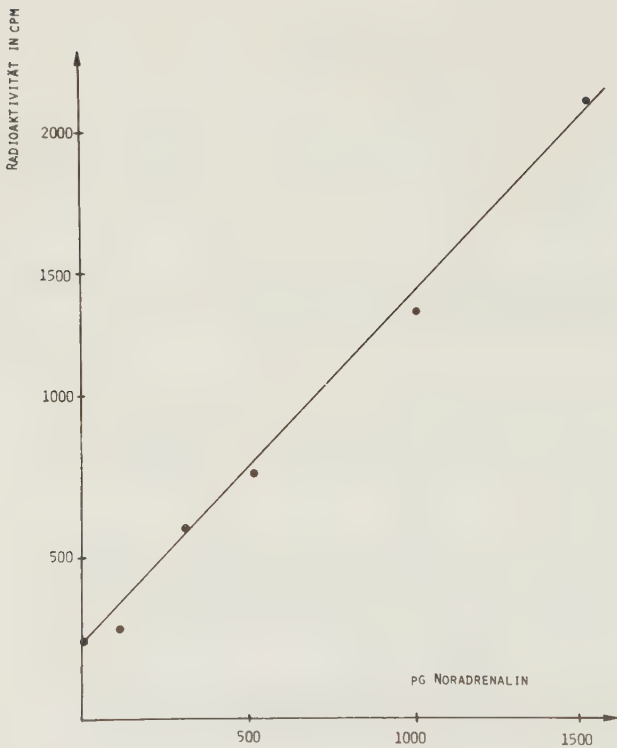


Abbildung 35:
Plasma-Eichkurve für Noradrenalin

des Adrenalins bei ungefähr 300 pg und erreicht ein Plateau (Abb. 36).

Folgende cpm-Werte werden bei unterschiedlichen Catecholaminmengen erzielt:

Substanz \ pg	100	300	500	1000	LW
Adrenalin	816	1159	1180	1330	667 cpm
Noradrenalin	294	602	773	1280	250 cpm

2.3.4.5 Analytische Zuverlässigkeitskriterien der Methode

Zur Messung der Präzision in der Serie wurde eine Plasmaprobe mehrmals auf ihren Adrenalin- bzw. Noradrenaliningehalt analysiert. Es ergab sich für die Adrenalinbestimmung ein Variationskoeffizient von 31%, für die Noradrenalinbestimmung ein Variationskoeffizient von 33%. Trotz intensiver Bemühungen konnten wir diese Werte nicht verbessern.

Wegen dieser Ergebnisse wurde auf die Bestimmung der Wiederauffindungsrate verzichtet. Der zeitliche Aufwand für 8 Plasmaanalysen, jeweils als

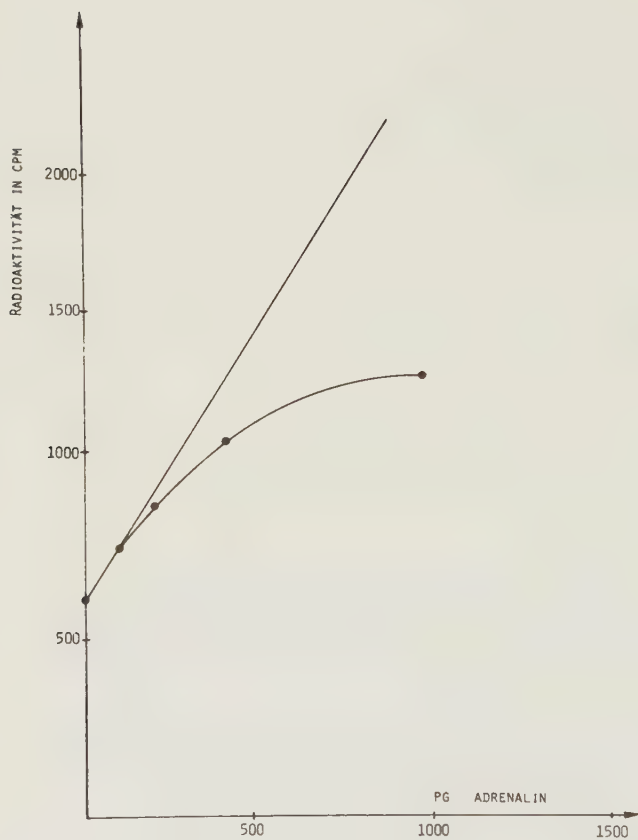


Abbildung 36:
Plasma-Eichkurve für Adrenalin

Doppelbestimmung ausgeführt, betrug
2 Arbeitstage.

Die Nachweisgrenzen lagen bei ungefähr
300 pg Adrenalin/ml Plasma bzw. 150 pg Nor-
adrenalin/ml Plasma.

2.3.5 Die Bestimmung der Gesamt-Catechol-
amine im Plasma nach COYLE u. HENRY (1973)

2.3.5.1 Geräte, Chemikalien und Lösungen
vgl. Kap. 5.3.3, S. 233

2.3.5.2 Probennahme und Probenlagerung
vgl. Kap. 5.3.1, S. 224

2.3.5.3 Arbeitsvorschrift
vgl. Kap. 5.3.3, S. 234

2.3.5.4 Eichung

Zunächst haben wir eine Eichkurve auf wässrigerer Basis mit 0,1; 0,5; 1; 2; 5 und 30 ng/Ansatz entsprechend 0,33 bis 99 ng/ml Wasser angesetzt (Abb. 37).

Plasmaadditionseichkurven mit einer Catecholaminzugabe von 0 bis 10 ng/ml Plasma zeigen ebenfalls ein lineares Verhalten (Abb. 38).

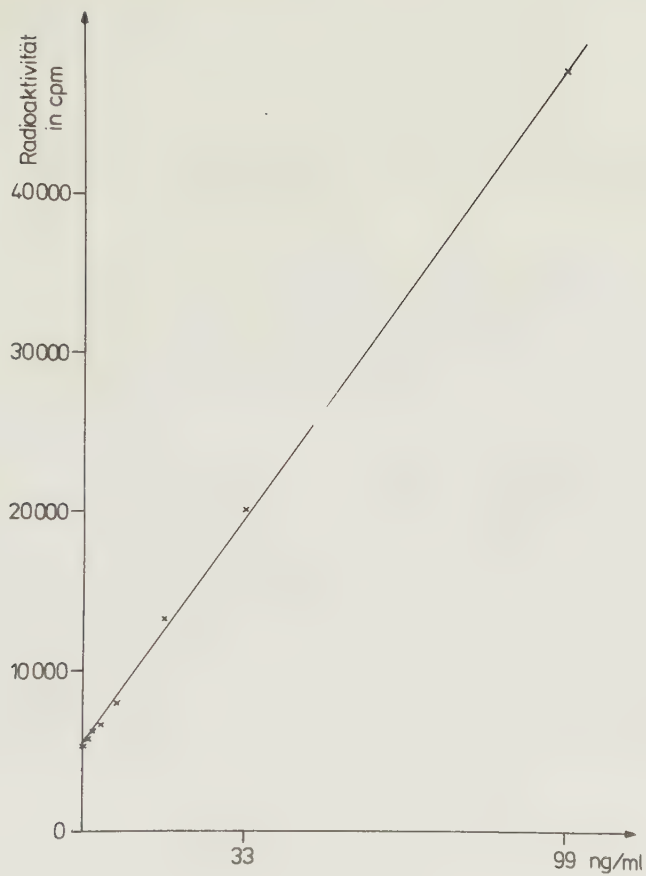


Abbildung 37:
Eichkurve für Gesamt-Catecholamine auf wässriger Basis

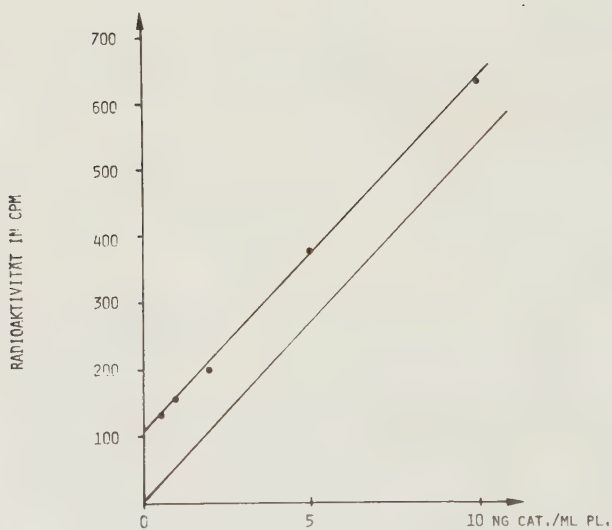


Abbildung 38:
Gesamt-Catecholamin-Additionseichkurve auf
Plasmabasis.
Die untere Kurve zeigt die graphische Sub-
traktion des Gesamt-Catecholaminspiegels
des Eichplasmas

2.3.5.5 Analytische Zuverlässigkeitskriterien der Methode

Zur Bestimmung der Präzision in der Serie wurde ein Plasma mit einem mittleren Gehalt von 2304 pg Gesamt-Catecholamin/ml Plasma 8mal analysiert. Hierbei ergab sich ein Variationskoeffizient von 6,8%.

Zur Bestimmung der Wiederauffindung wurde zu Plasmaproben mit einer Gesamt-Catecholaminkonzentration von 425 pg/ml eine Menge von 4000 pg Catecholamin zugesetzt. Die Analyse ergab einen Catecholamingehalt von 4120 pg, was einer Wiederauffindungsrate von 92,4% entspricht.

Als Nachweisgrenze ergaben sich ca. 200 pg Gesamt-Catecholamin/ml Plasma.

2.3.6 Die quantitative Bestimmung von Noradrenalin im Plasma

2.3.6.1 Geräte, Chemikalien und Lösungen

vgl. Kap. 5.3.4, S. 236

2.3.6.2 Probennahme und Probenlagerung

vgl. Kap. 5.3.1, S. 224

2.3.6.3 Arbeitsvorschrift

vgl. Kap. 5.3.4, S. 240

2.3.6.4 Erstellung von Eichkurven

Plasma wird wie in Kap. 5.3.4, S. 242 beschrieben mit definierten Mengen an Noradrenalin versetzt und diese Eichreihe der normalen Aufarbeitung unterzogen.

Für die Erstellung der Eichkurve werden die bereits mit dem internen Standard korrigierten cpm-Werte eingesetzt. Der Blank-Wert wird ebenfalls nach seiner Wiederauffindungsrate korrigiert und von den Eichkurven-Meßwerten subtrahiert. Beispielhaft ist in Abbildung 39 eine solche Eichkurve dargestellt. Durch Parallelverschiebung der Eichgeraden durch den Nullpunkt wird die für die Auswertung benötigte Kurve erhalten.

2.3.6.5 Analytische Zuverlässigkeitskriterien der Methode

Zur Ermittlung der Präzision in der Serie analysierten wir ein Humanplasma mit einem mittleren Gehalt von 364,5 pg NA/ml Plasma 10 mal. Aus den Ergebnissen errechnete sich ein Variationskoeffizient von 5,6%.

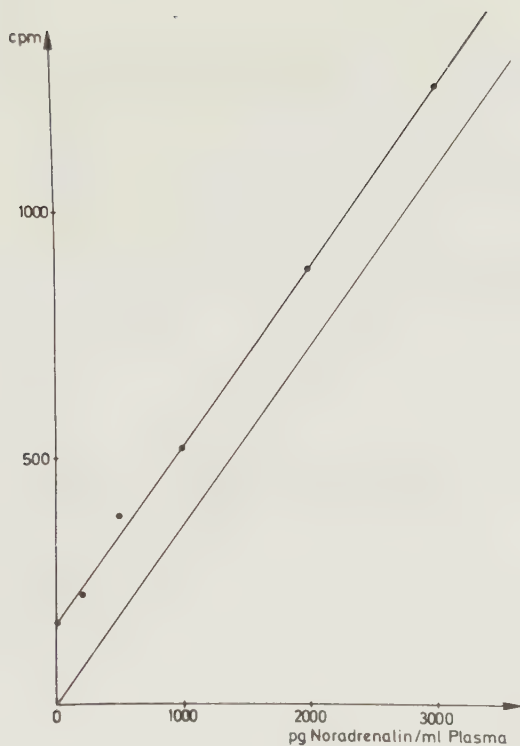


Abbildung 39:

Beispiel einer Eichkurve für die Bestimmung von Noradrenalin im Plasma.

Die untere Kurve zeigt die graphische Subtraktion des Noradrenalinpiegels des Eichplasmas

Da die Eichkurven durch Addition definierter Mengen an Noradrenalin zu einer Plasmaprobe erstellt werden, ist die Ermittlung der Richtigkeit der Methode durch Wiederauffindungsversuche wenig sinnvoll.

Als Nachweisgrenze kann ein Wert von ca. 50 pg NA/ml Plasma angegeben werden. Bei dieser Konzentration unterscheidet sich die cpm-Zahl der Probe noch deutlich von den Blank-Werten.

2.3.6.6 Berechnung des Analysenergebnisses mit dem Doppelisotopenverdünnungsverfahren

Die Auswertung dieser Doppelisotopenanalyse erfolgt mit einem Computer-Rechenprogramm. Im Einzelnen wird dabei in folgenden Rechenschritten vorgegangen:

1. Subtraktion der Zählgläschenleerwerte (LW_A , LW_B) der Szintillationsflüssigkeit von den Meßwerten im Kanal 3-H- bzw. 14-C

$$cpm_{\text{Kanal A}} - LW_A = W_A$$

$$cpm_{\text{Kanal B}} - LW_B = W_B$$

2. Berechnung der cpm-Werte im Kanal A (K_R)
aus der Kreuzreaktion des 14-C von Kanal B
(11,47%)

$$K_R = 0,115 \cdot W_B$$

3. Subtraktion dieses Wertes (K_R) von W_A

$$W_A - K_R = A_{\text{kor.}}$$

4. Korrektur der cpm-Ausbeute im Kanal A
nach der in Kanal B gemessenen Wieder-
auffindungsrate,

$$C = \frac{A_{\text{kor.}} \cdot St}{W_B}$$

wobei C nach Abziehen des ebenfalls korri-
gierten Blanks der für die Ablesung aus
der Eichkurve notwendige Wert ist
(St in cpm stellt die Radioaktivität des
eingesetzten 14-C-Adrenalins dar).

2.3.7 Diskussion

Die angegebene Methode zur Bestimmung der Gesamt-
Catecholamine im Plasma ist für den Routineeinsatz
geeignet. Bei direkter Verwendung von Plasma

lassen sich gute Ergebnisse bei relativ niedrigem Zeitaufwand erzielen. Die analytischen Zuverlässigkeitskriterien wie Präzision, Richtigkeit und Nachweisgrenzen entsprechen den Anforderungen, welche im klinisch-chemischen Laboratorium an eine Methode gestellt werden.

Zur Vereinfachung, Verbesserung und Standardisierung aller von uns entwickelten Analysenmethoden für die Catecholamin-Bestimmung im Plasma war es notwendig, systematisch die eingesetzten Reagenzien und Reaktionsschritte zu untersuchen. Insbesondere wurden überprüft die Konzentration der verschiedenen Lösungen, die Qualität der Enzympräparationen und die Reproduzierbarkeit der einzelnen Reaktionsschritte. Diese grundlegenden Experimente erfolgten am Beispiel der Gesamt-Catecholaminbestimmung nach PASSON und PEULER (1973).

Die Methylierungsreaktion, bei der mit dem Enzym Catechol-Sauerstoff-Methyltransferase die radioaktiv markierte Methylgruppe auf die Catecholamine übertragen wird, nimmt eine Schlüsselrolle beim radiochemischen Nachweis dieser Amine ein. Die Kenntnis über einzusetzende Konzentrationen und Qualität der Enzympräparation sind wichtige Faktoren für das Gelingen der Analyse.

Von uns durchgeführte Literaturstudien ergaben ein uneinheitliches und verwirrendes Bild über Stabilität und optimale Arbeitsbedingungen des Enzyms. Insbesondere gilt dies für die Konzentrationen des Cosubstrat SAM, des Magnesiumchlorids sowie Ionenstärke und Art des verwendeten Puffers.

In der Literatur werden für den Inkubationsansatz vor allem Tris- bzw. Phosphat-Puffer eingesetzt. Die Tabelle 7 enthält eine Übersicht über die gefundenen pH-Werte, die Puffer-, Magnesiumchlorid- sowie Cosubstrat-Konzentrationen. Weiterhin zeigt sie die gebräuchlichen Enzymstabilisatoren und Reduktionsmittel zum Schutz der Catecholamine vor Oxidation.

Während Tabelle 7 eine Zusammenstellung der von anderen Autoren erwähnten Bedingungen zur Bestimmung der COMT wiedergibt, sind in Tabelle 8 die Reaktionsbedingungen für die Catecholaminanalyse zusammengefaßt. Wie die Aufstellung zeigt, schwanken die Angaben in der Literatur um mehrere Größenordnungen. Die Ursachen hierfür dürften in der Zusammensetzung der COMT aus mehreren Isoenzymen und in der Beeinflussung der Methylierungsreaktion durch Metallionen, pH-Werte und der Qualität des 3-H-SAM liegen.

Autor	Puffersystem Puffer- konzentration	pH-Wert des Puffers	Magnesiumchlorid- konzentration	Cosubstrat (SAM) Konzentration	Stabilisatoren
GRIFFITHS, J. (1972)	Sörensen- Puffer 0,25 M	7.8	0,01 M	190 μ M	
FLOHE, L.	Kaliumphos- phatpuffer 0,2 M	7.3	0,01 M	250 μ M	
FRERE, J. M. (1971)	Phosphatpuffer 0,046 M	7.8	0,02 M	220 μ M	Cystein
CREVELING, C. R. (1972)	Phosphatpuffer 0,1 M	8.0	0,012 M	100 μ M	Dithioerythrit 2 m M
BORCHARDT, R. B. (1974)	N-Tris (hydro- xymethyl)-2- aminoäthan- sulfonic acid (TES) 0,040 M	7.6	1,2 mM	1000 μ M	Dithioerythrit 4 m M
AXELROD, J. (1971)	Phosphatpuffer 0,08 M	7.9	0,017 M	1.7 μ M	
AXELROD, J. (1958)	Phosphatpuffer 0,05 M	7.8	0,01 M	150 μ M	

Tabelle 7: Zusammenstellung der Reaktionsbedingungen für die COMT-Aktivitätsbestimmung

Autor	Plasma- menge (ml)	Puffersystem Puffer- konzentration	pH-Wert	Mg Cl ₂	SAM	³ H, ¹⁴ C-SAM	Stabilisatoren
SIGGERS, D. C. (1970)	10	Der Autor gibt kein Phosphatpuffer 50 µmol	7.8	50 µmol		14-C; 50 µCi	Natriumcitrat (4 mg/ml Plasma) Ascorbinsäure (2 mg/ml)
ENGELMAN, K. (1968)	10	Phosphatpuffer +N-ethyl- -morpholine 0,05 M	8.5	für Urin- Standards: 0,005 M Plasma: 0,05 M	10 ⁻⁵ M	14-C; 0,5 µCi	dto. und beim Inkubations- ansatz Ascorbinsäure: 10 ⁻⁴ M
ENGELMAN, K. (1970)	10	dto.	dto.	dto.	dto.	dto.	wie 1968: außer Addition von 0,2M EDTA vor Säulenchromatographie
CHRISTENSEN, N. J. (1973a)	10	Phosphatpuffer 0,05M	8.5	0,025M	6.25 x 10 ⁻⁶ M	14-C; 0,5 µCi	Ascorbinsäure und EDTA (je 2mg/ml Vollblut) Inkubationsansatz: 18 mg Ascorbinsäure/l
CHRISTENSEN, N. J. (1973b)	10	0,05M	8.5	0,025M	dto.	dto.	dto.
COYLE, J. T. (1973)	-	Tris x Cl	< 9.6	0,0012M	1.3 x 10 ⁻⁶ M	3-H; 2,5 µCi	Dithioerythrit
PASSON, P. G. (1973)	0,25- 0,75	Tris x Cl 0,08 M	8.2	0,024M	10 x 10 ⁻⁶ M	3-H; ~1 µCi	1 mM GSH, 0,22 mM Pargyline
CRYER, P. E. (1974)	1	dto.	dto.	dto.	dto.	dto.	dto.

Tabelle 8: Zusammenstellung der Reaktionsbedingungen für die Catecholaminbestimmung

Bei der Herstellung der COMT aus Rattenlebern werden lediglich einfache Aufarbeitungsschritte wie partielle Eiweißfällungen und Dialyse eingesetzt. Die erhaltene Präparation stellt deshalb kein einheitlich reines Enzym dar. Diese Tatsache ist u.U. für die großen Qualitätsunterschiede verschiedener Enzympräparationen verantwortlich.

In der Vergangenheit wurde mehrfach versucht, die COMT mit Hilfe der Säulenchromatographie in reiner Form herzustellen (BALL et al. 1972, FLOHE u. SCHWABE 1970, FRERE u. VERLY 1971). Schwierigkeiten ergaben sich dabei vor allem durch die Inhomogenität des Enzyms. Man vermutete deshalb, daß die COMT sich aus mehreren Isoenzymen zusammensetzt. Diese konnten z.T. bereits voneinander isoliert werden. Durch die Bestimmung eines isoelektrischen Punktes und mit Hilfe der Disk-Elektrophorese erhärtete sich für uns diese Hypothese.

Den o.g. Autoren (BALL 1972, FLOHE 1970, FRERE 1971) gelang es, das Enzym um den Faktor 380 gegenüber dem Ausgangsmaterial anzureichern und zu reinigen. Die Präparationen verloren allerdings im Gegensatz zur ungereinigten COMT schnell ihre Aktivität. Die Ursache dürfte darin liegen, daß durch die Säulenchromatographie enzymstabilisierende Proteine von der COMT abgetrennt werden.

Sehr große Unterschiede bestehen zwischen Enzympräparationen, die aus Lebern verschiedener Tierarten gewonnen werden.

Für die Optimierung der Catecholaminanalysen erschien es uns notwendig, daß die COMT in hochreiner Form vorliegt. Dieser Wunsch resultierte zum einen aus Gründen der Standardisierung, zum anderen, um hohe Leerwerte zu vermeiden. AXELROD u. COHN (1971) erklärten die hohen Leerwerte durch die Existenz eines sog. "methanolbildenden Enzyms". Dieses Enzym kommt in denselben Geweben und Organen wie die COMT vor und besitzt ähnliche Eigenschaften. Es ist in der Lage, aus 3-H-SAM entweder durch Methylierung von Wasser oder durch Hydrolyse von SAM (AXELROD u. DALY 1965) 3-H-Methanol zu produzieren.

Die eigenen Versuche zeigten, daß die nach der Säulenchromatographie verbliebene Enzymaktivität (insgesamt nur wenige 100 cpm) im Vergleich zu den eingesetzten 6.790.000 cpm verschwindend gering ist. Auch die Zugabe von Mercaptoethanol als Enzymstabilisator, das Vermeiden höherer Temperaturen (Arbeitstemperatur: 1°C) und die sofortige Lagerung bei -80°C konnte den schnellen Zerfall des hochgereinigten Enzyms nicht verhindern.

Bei der Säulenelution von Enzympräparaten tritt durch die mobile Phase stets ein starker Verdünnungseffekt auf. Wir haben deshalb nach Möglichkeiten gesucht, die Enzympräparationen wieder einzuengen und eine Anreicherung zu erzielen.

In einem Versuch wurde die COMT-Präparation lyophilisiert und in der gleichen Menge Puffer wieder aufgenommen. Die Aktivitätsbestimmung ergab, daß eine Abnahme von 36% erfolgte. Bei Wiederaufnahme in kleineren Puffermengen konnte eine Erhöhung der Enzymaktivität pro Volumeneinheit erzielt werden.

Trotz dieser anfänglichen Mißerfolge erscheint es uns sinnvoll, weitere Versuche zur Enzympräparation mit der Säulenchromatographie vorzunehmen. Durch den Einsatz schnellerer und steilerer Puffergradienten bei der Säulenchromatographie könnte die Elutionszeit verkürzt werden. Die Entwicklung enzymstabilisierender Puffer als mobile Phase sind Voraussetzung für eine erfolgreiche Arbeit.

Jede frisch hergestellte Enzympräparation haben wir zunächst auf ihren Eiweißgehalt und ihre Aktivität getestet. Dies diente der Kontrolle und gewährleistete, daß das Enzym von gleichbleibender Qualität war. Die Aktivitätsbe-

stimmung ergab durchschnittlich 12 bis 16 U/l. Da für jeden Catecholaminansatz ca. 100 µl der Enzympräparation eingesetzt wurden, läßt sich errechnen, daß in einer Stunde ca. 20 µg Catecholamin methyliert werden könnten, d.h. die verwendete Menge an Enzym ist auch bei unterschiedlichen Präparationen auf jeden Fall mehr als ausreichend.

Wichtig für die Analyse ist die Stabilität des Enzyms bei verschiedenen Temperaturen. Versuche zeigten, daß die COMT-Präparation im Eisbad im Zeitraum von 1 Stunde keinen signifikanten Aktivitätsabfall erleidet. Die Aktivität der COMT steigt mit höherer Temperatur (GOSSLER u. SCHALLER 1975). Der lineare Zusammenhang zwischen Enzymaktivität und Temperatur ist in Abbildung 32 dargestellt. Die höchsten Aktivitäten wurden bei Temperaturen über 40°C erzielt.

Mit steigender Temperatur nimmt die Denaturierung des Enzyms stark zu, so daß es nur über kurze Zeiträume einsatzbereit ist. Bei einer Inkubationstemperatur von 37°C bleibt das Enzym bis zu mehrere Stunden stabil und im linearen Bereich (GRIFFITHS u. LINKLATER 1972, RAYMOND u. WEINS-HILBOUM 1975). Diese Temperatur wurde deshalb bei allen Versuchen verwendet.

Als Inkubationsdauer ist ein Zeitraum von 45 und 60 Minuten optimal. Wird die Inkubationszeit

verlängert, werden die Leerwerte höher.

Wie bereits in der Einleitung (Kapitel 1) beschrieben, sind die Catecholamine äußerst oxidationsempfindliche Substanzen. Dies gilt insbesondere für den alkalischen Bereich. In diesem liegt auch das Maximum der COMT-Aktivität mit einem pH-Wert von ca. 8.0. Bereits ENGELMAN (1968 und 1970) verwendete daher Ascorbinsäure als Reduktionsmittel im Inkubationsansatz. Neuere Untersuchungen (BLASCHKO u. HERTTING 1971) haben jedoch gezeigt, daß Ascorbinsäure die Methylierung der Catecholamine beeinträchtigt, in höheren Konzentrationen sogar völlig stoppt. Reduziertes Glutathion hingegen hemmt die Methylierungsreaktion bei Konzentrationen von 1 bis 11 mMol nicht (PASSON u. PEULER 1973). Eigene Versuche bestätigten diesen Befund. GSH-Mengen im doppelten Überschuß inhibierten die Reaktion lediglich um 13%. Erst bei einer demgegenüber hundertfachen GSH-Menge wurde die Enzymaktivität um 77% gehemmt.

Andere Autoren (COYLE u. HENRY 1973) verwendeten als Oxidationsschutz Dithioerythrit oder Mercaptoethanol. Diese Substanzen sollen den Vorteil haben, gleichzeitig als Enzymaktivatoren zu wirken. Eigene Versuche liegen hier nicht vor.

Die Monoaminoxidase (MAO) kann in Zusammenarbeit mit Aldehyddehydrogenase und COMT Adrenalin und Noradrenalin zu Vanillinmandelsäure bzw. Vanillinsäure umsetzen. Sowohl die MAO als auch die COMT sind in der Leber angereichert. Die MAO ist in geringen Mengen in der Enzympräparation. Auch das eingesetzte Plasma enthält MAO-Aktivitäten.

Die Zugabe von MAO-Inhibitoren zu den Inkubationsansätzen soll diese in vitro Nebenreaktionen unterbinden. Wir verwendeten hierzu Niamid[®] (β -(N'-Isonicotinylhydrazino) -propionsäurebenzylamid) und neuerdings Pargyline[®] (N-Benzyl-N-methylpropionylamin-Hydrochlorid). Beide Substanzen wirken, wie die Versuche ergaben, weder inhibierend noch stimulierend auf die Methylierung der Catecholamine.

Eine Radioreagenzmethode ist in besonderem Maße von der spezifischen Aktivität und Reinheit des eingesetzten Substrates, in unserem Falle des 3-H-SAM, abhängig. Aus dessen spezifischer Aktivität ergibt sich die Empfindlichkeit der beschriebenen Meßmethode, da die Zähllausbeute in linearem Zusammenhang mit der eingesetzten spezifischen Aktivität steht. SAM ist relativ instabil und zerfällt sehr leicht. Beschleunigt wird diese Zersetzung noch durch die Energieabgabe der

radioaktiv markierten SAM-Moleküle. Demgemäß sind der spezifischen Aktivität des 3-H-SAM dort die Grenzen gesetzt, wo der radioaktive Zerfall der Tritium-Atome selbst bei Tiefkühlung eine chemische Zersetzung der SAM-Moleküle bewirken würde. Dem SAM-Einsatz sind daher ökonomische und technische Grenzen gesetzt.

Das zuerst benutzte SAM mit der spezifischen Aktivität von 240 $\mu\text{Ci}/\text{mMol}$ ergab nur 3 dpm/pg Catecholamin. Somit errechnete sich für die Plasma-Catecholaminbestimmung im Normbereich eine Ausbeute von ca. 500 cpm/Ansatz.

Durch Verwendung einer 3-H-SAM-Handelscharge mit höherer spezifischer Aktivität konnten wir in späteren Versuchen die Empfindlichkeit des Catecholamin-Bestimmungsverfahrens wesentlich steigern.

Neben den Parametern der Methylierungs-Reaktion waren auch die weiterverarbeitenden Schritte, wie Einengung, Vanillinoxidation und die Extraktion zu überprüfen.

Wir konnten zeigen, daß die Einengung des Toluol/Isoamylalkohol-Gemisches am Rotationsverdampfer einen Variationskoeffizienten von bis zu 20% ergeben kann. In einem von uns entwickelten

und später diskutierten Verfahren wurde daher versucht, das Einengen am Rotationsverdampfer zu umgehen und lediglich mit Flüssig-Flüssig-Extraktionen auszukommen (vgl. Methode 2.3.5, S. 110):

Die Überprüfung des Vanillinoxidationsschrittes erfolgte ebenfalls mit tritiummarkiertem Metanephrin und Normetanephrin. Die erhaltenen Eichkurven und die Wiederauffindungsraten von ca. 100% zeigen, daß die Oxidation der Metanephrene mit Perjodat zu Vanillin reproduzierbar und verlustfrei ausgeführt werden kann.

Die beste Szintillationsflüssigkeit mit hohen Zählausbeuten bei relativ niedriger Quenchzahl war der Fertigcocktail von N.E.N.

Trotz zahlreicher Vereinfachungen und Überprüfungen aller Analysenschritte muß betont werden, daß die Analysenmethode in der jetzigen Form nur bedingt für den klinischen Routinebetrieb geeignet ist.

Von großer Bedeutung für die klinische Chemie und die arbeitsmedizinische Stress-Forschung ist die fraktionierte quantitative Bestimmung von Adrenalin und Noradrenalin im Blut. Benutzt

man zur Analyse wiederum das radioenzymatische Markierungsverfahren, so müssen das entstehende Metanephrin bzw. Normetanephrin voneinander und von den anderen Catecholamin-ähnlichen Substanzen abgetrennt werden. Wegen der großen chemischen Ähnlichkeit der Catecholamine eignen sich herkömmliche Verfahren wie z.B. Extraktionen nicht für eine Auftrennung. Als Trennmethoden bieten sich vor allem die Dünnschichtchromatographie (DC) (ENGELMAN u. PORTNOY 1970, PASSON u. PEULER 1973), die Elektrophorese (SCHWEITZER u. FRIEDHOFF 1969, SIGGERS et al. 1970), die Säulenchromatographie (Mc DONALD u. MURPHY 1973) und die Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) (MERZHÄUSER et al. 1973, REFSHAUGE et al. 1974) an.

Wegen der geringen Trennschärfe bzw. des großen apparativen Aufwandes wurden von uns die Elektrophorese und die Niederdruck-Säulenchromatographie nicht berücksichtigt. Dagegen prüften wir die Dünnschichtchromatographie (DC) und die Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) (vgl. 2.4) als schnelle, apparativ einfach zu handhabende Trenntechniken ausführlich.

Bei der DC-Technik wurde nach bandförmiger Auftragung des Untersuchungsmaterials die Dünnschichtplatte mit geeigneten Laufmitteln ent-

wickelt. Das Metanephrin und Normetanephrin haben wir durch Auftragung von Referenzsubstanzen am Plattenrand markiert. Man schabt die korrespondierenden Banden ab und eluiert die Metanephrene. Die weiteren Schritte zur quantitativen Erfassung der getrennten Catecholamine sind identisch mit der Bestimmung der Gesamt-Catecholamine.

Entscheidend für eine einwandfreie Auftrennung der Catecholamine ist die Güte des verwendeten dünnsschichtchromatographischen Verfahrens. Sie beeinflusst die Zuverlässigkeit der gesamten Analyse. Dabei kam es zum einen auf die möglichst gute Trennung der beiden Substanzen an, zum anderen auf eine Optimierung der Chromatographiebedingungen, um den Zeitaufwand möglichst niedrig zu halten. Zur Auswahl dieser Chromatographiebedingungen testeten wir Dünnschichtplatten mit verschiedenen Sorbentien und variierten die mobile Phase in Zusammensetzung und Konzentration.

Zur Optimierung der DC-Bedingungen wurde eine Lösung von Metanephrin- und Normetanephrin-Standards in Ethanol von jeweils 1 mg/ml hergestellt. Davon trägt man 10 bis 20 μ l auf die Dünnschichtplatte auf. Als Sprühreagenz haben wir generell para-Nitroanilindiazoniumchlorid verwendet. Dieses Reagenz ergibt mit den Catecholaminen einen blauen Farbkomplex.

Als Fließmittel wurden sowohl die mobilen Phasen geprüft, die in der Literatur für die Catecholaminanalytik angewendet werden (ENGELMAN u. PORTNOY 1970, PASSON u. PEULER 1973) als auch von uns entwickelte Fließmittelzusammensetzungen (vgl. Tab. 10). Deren Art und Zusammensetzung ergab sich meist aus den erzielten Ergebnissen.

Als Sorbens wurde aus Praktikabilitätsgründen acetylierte Cellulose und Kieselgel G mit und ohne Fluoreszenzindikator getestet.

Die in der Literatur auch für kleinere Catecholaminmengen beschriebene Fluoreszenzlösung bei 254 oder 360 nm konnte von uns erst bei relativ hohen Konzentrationen beobachtet werden. Wir haben uns daher für die Anwendung von Dünnschichtplatten ohne Fluoreszenzindikator entschieden. Die Lokalisation der Meta- bzw. Normetanephrinbanden erfolgte durch Vergleich mit angefärbten Referenzspots.

Bei Verwendung von triacetylierter Cellulose als Trägermaterial ist die Reihenfolge der Auftrennung von Metanephrin und Normetanephrin im Vergleich zum Kieselgel umgekehrt.

Die erzielten Ergebnisse mit diesem Trägermaterial in Abhängigkeit von den verwendeten mobilen Phasen

sind in Tabelle 9 zusammengestellt. Neben den R_F -Werten für die beiden Substanzen und der Dauer der Chromatographie sind noch makroskopische Beobachtungen aufgeführt. Es ist ersichtlich, daß die Trennungen der beiden Substanzen nicht einwandfrei waren. Es wurden deshalb Versuche mit Kieselgel G-Platten fortgeführt.

Die von uns erhaltenen Ergebnisse mit dem Träger Kieselgel G sind in Tabelle 10 zusammengestellt. Besonders die von PASSON u. PEULER (1973) beschriebene mobile Phase liefert sehr gute Trennergebnisse. Nachteilig ist jedoch der relativ hohe Zeitaufwand für die Chromatographie. Bei unserer Suche nach einer geeigneten mobilen Phase hat sich uns die Mischung Essigester/Methanol/Ameisensäure (60/35/5) als besonders günstig erwiesen. Bei guter Trennleistung beträgt die Laufzeit auf der Dünnschichtplatte nur 50 Minuten. Um eine gute Trennung zu erreichen, muß allerdings die Technik der Mehrfachchromatographie angewendet werden, d.h. man läßt die Lösungsmittelfront bis zum Plattenende laufen, trocknet die Dünnschichtplatte und chromatographiert nochmals. Es ergibt sich eine gesamte Chromatographiezeit von ca. 2 Stunden. Unter diesen Bedingungen wird Metanephrin vom Normetanephrin ca 2 cm abgetrennt. Es lassen sich so ohne Schwierigkeiten die beiden Substanzen separat voneinander abschaben. Die in den Abbildungen 35 und 36 gezeigten Eichkurven sind mit diesem System erstellt worden.

mobile Phase	Rf-Werte Meta- nephrin	Laufzeit Minuten	Bemerkungen
n-Butanol/Ameisensäure/ Wasser 60/10/6 ENGELMAN 1970	0,48	100	Spots unscharf, daher Trennung ungenügend, Reihenfolge Metanephrin-Normetanephrin umgekehrt wie bei Kieselgel
Essigester/Methanol/ Ameisensäure 60/35/5	-	25	Starkes Tailing Trennung ungenügend
n-Butanol, gesättigt mit 3n HCl HEYMAN 1965	0,44	110	Scharfe Trennung, jedoch R _f - Werte zu nahe beieinander
n-Butanol/Essigsäure/ Wasser 60/15/75	0,60	105	dto.
Äthylalkohol (70 %)	0,39	~ 180	Tailing; Trennung ungenügend
Äthanol (96 %) Ammoniak (25 %) 4:1	0,77	0,62	Spots verwaschen
n-Butanol/Pyridin/ Wasser 4/1/1 STERN 1967			Doppelspots, starkes Tailing

Tabelle 9: Dünnschichtchromatographische Trennung von Metanephrin und Normetanephrin auf acetylierter Cellulose

mobile Phase	R _f -Werte		Laufzeit Minuten	Bemerkungen
	Meta- neph	Normeta- neph		
n-Butanol/Ameisensäure/ Wasser 60/10/6 ENGELMAN 1970	0,33	0,41	100	Trennung gut
Essigester/Methanol/ Ameisensäure 60/35/5	0,27	0,38	50	Trennung sehr gut
n-Butanol/Essigsäure/ Wasser 60/15/75	0,28	0,34	105	Trennung gut, R _f - Werte jedoch zu nahe beieinander
Ethanol (70 %)	0,38	0,45	~ 180	Tailing
Ethanol (96 %) Ammoniak (25 %) 4 : 1	0,50	0,52		Keine ausreichende Trennung
Isopropanol/n-Butanol/ Ameisensäure/Wasser 60/20/1/19 PASSON 1973	0,42	0,53	~ 180	Trennung sehr gut

Tabelle 10: Dünnschichtchromatographische Trennung von Metanephlin und Normetanephlin auf Kieselgel G

Zur Lokalisation der Referenzflecken ist die Ausführung einer Farbreaktion auf der Dünnschichtplatte notwendig. Es wurden folgende Sprühreagenzien aus methanolischer Kaliumhydroxid-, Jod-, saurer Kaliumpermanganat- und p-Nitroanilin -diazonium-chlorid-Lösung untersucht (die Herstellung der Lösungen ist in Kap. 5.3.5, S. 243 beschrieben).

Die mit den drei zuerst aufgeführten Lösungen gewonnenen Farbflecken (braun bis rosa) entwickelten sich sofort, waren aber nur begrenzte Zeit sichtbar. Dagegen zeigten sich die mit para-Nitroaniliniumdiazoniumchlorid-Lösung erhaltenen orangen Anfärbungen über lange Zeit stabil.

Zur Elution der Metanephrene vom Kieselgel haben wir verschiedene Lösungsmittel getestet. Diese Untersuchungen wurden mit ¹⁴C-markiertem Normetanephrin und Metanephrin durchgeführt. Die Höhe der gemessenen Aktivitäten in den verschiedenen Lösungsmitteln war ein Maß für die Güte des Eluenten. Zusätzlich erfolgten von uns Studien mit nichtmarkiertem Metanephrin und Normetanephrin.

Die Substanzen wurden auf Dünnschichtplatten aufgetragen und mit den verschiedenen Lösungsmittel-

Gemischen in der Kammer entwickelt. Zur Interpretation dieser Untersuchungen gilt allgemein, daß diejenige mobile Phase zur Elution am besten geeignet ist, bei der die Substanz mit der Lösungsmittelfront läuft. Geprüft wurden verschiedene Alkohole, Säuren und Laugen. Die besten Ergebnisse erzielten wir mit 4 M Ammoniak.

Die beschriebene Methode zur fraktionierten Bestimmung der Catecholamine ist trotz intensiver Methodenentwicklung auch heute nicht frei von Problemen. So weisen die cpm-Zählraten der Blanks und die der Plasma- Leerwerte je nach Ansatz und Plasma unterschiedliche Werte auf. Das bestätigten auch neuere Untersuchungen von WISSER et al. (1979). Wir führten dies auf inhibierende Einflüsse von Plasmabestandteilen auf die enzymatische Methylierung zurück. Die Probenvorbereitung mit Aluminiumoxid bzw. Ionenaustauscher-Chromatographie vor der Inkubation brachte keine Elimination dieser "Plasma-Matrixeffekte".

Zur Klärung dieses Phänomens haben wir von verschiedenen Plasmaproben mit und ohne Catecholaminzusatz (200 pg Adrenalin oder 200 pg Noradrenalin) Dünnschicht-Radiochromatogramme angefertigt.

Auf den Einsatz von Schutzgas in den DC-Kammern wurde wegen der Stabilität der Metanephrine ver-

zichtet. Im einzelnen wird nach normaler Aufarbeitung bis einschließlich der Dünnschichtchromatographie die Platte nach dem Abtrocknen in 3 mm breite Bahnen parallel zur Auftraglinie eingeteilt. Das Kieselgel in jeder nummerierten Bande wird mit einem Spatel abgeschabt. Die Elution der auf dem Trägermaterial haftenden Substanzen nimmt man wie üblich vor. Die ammoniakalischen Überstände gibt man dann in Szintillationsgläschen und dampft im Sandbad zur Trockene ein. Dann wird die Radioaktivität der Fraktionen nach Zugabe von 10 ml Bray's Solution und gründlichem Schütteln im Szintillationszähler gemessen.

Die Radiochromatogramme eines wässrigen Leerwertes und einer Addition von je 200 pg Catecholamin/Ansatz sind in Abbildung 40 dargestellt.

Bemerkenswert ist, daß auch beim Leerwert in der Höhe der Metanephrin- bzw. Normetanephrin-Referenzflecken Peaks vorliegen. Dies konnte durch mehrere Radiochromatogramme bestätigt werden. Eine Erklärung für diesen Befund kann bis jetzt noch nicht gegeben werden. In Abbildung 41 ist das Dünnschicht-Radiochromatogramm einer aufgearbeiteten Plasmaprobe dargestellt. In der Höhe der Metanephrin- und Normetanephrin-Referenzspots

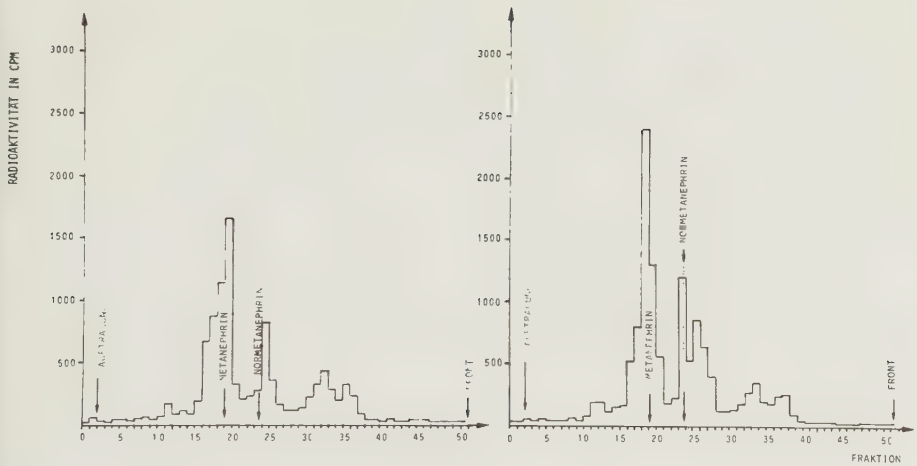


Abbildung 40:
 Dünnschicht-Radiochromatogramm eines wässrigen
 Leerwertes (links) und eines Eichpunktes von
 200 pg Catecholamin/Ansatz (rechts)

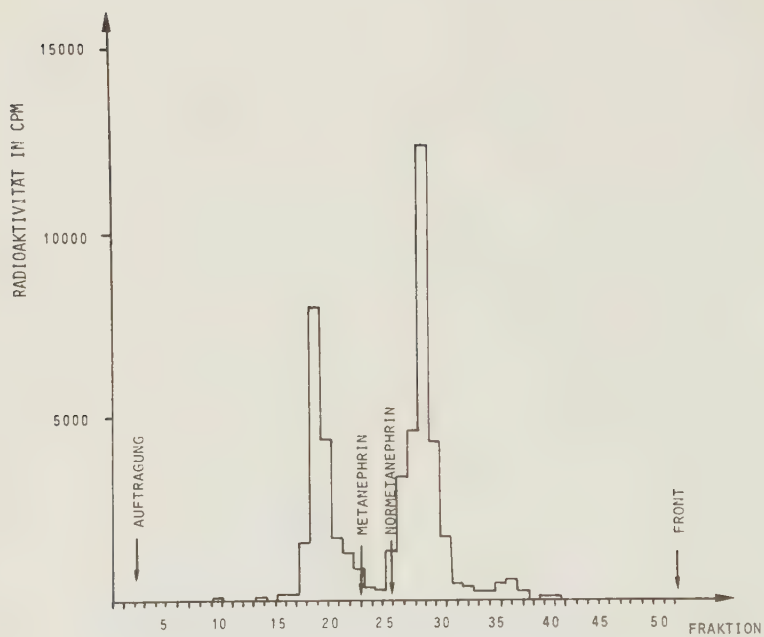


Abbildung 41:
Dünnschicht-Radiochromatogramm einer aufgearbeiteten Plasmaprobe

sind keine Peaks erkennbar - dagegen hohe Radioaktivitäten in der Höhe der Fraktionen 19 und 28. Offensichtlich stimmen die Peaks in einigen Fällen nicht mit den R_f -Werten der Referenzspots überein.

In der beschriebenen Form gestaltet sich die quantitative Erfassung von Adrenalin und Noradrenalin im Serum als recht aufwendig. Für acht Analysen in Form von Doppelbestimmungen mußten von uns bisher 5 Arbeitstage aufgewendet werden. Der Zeitaufwand kann allerdings durch den Einsatz eines automatischen Dünnschicht-Applikators und durch die Anwendung von Pipettoren etwas verringert werden.

Wir sind der Meinung, daß beim heutigen Erkenntnisstand mit dieser Methode keine zuverlässigen Ergebnisse in der Routine erzielt werden.

Für die Entwicklung und Übertragung der von COYLE u. HENRY (1973) an Gewebehomogenaten beschriebenen Methode auf die Plasma-Catecholamin-Analyse mußten wir verschiedene Änderungen des Verfahrens vornehmen. Optimiert wurde insbesondere der Inkubationsansatz durch die Variation des pH-Wertes. COYLE u. HENRY (1973) verwendeten einen pH-Wert von 8.6. Wir testeten Inkubationsmischungen mit den pH-Werten von 7,5; 7,75; 8,0; 8,25; 8,5; 8,75 und 9,0.

Die Inkubationen erfolgten in Gegenwart der üblichen Menge an Plasmaüberstand. Zusätzlich wurde jedem Ansatz 30 ng Adrenalin zugegeben.

In Abbildung 42 sind die Ergebnisse dieses Versuches dargestellt. Die eingezeichneten Leerwerte wurden unter Weglassen von Plasmaüberstand und Catecholaminstandard gemessen. Die oberste Kurve zeigt die cpm-Ausbeute für die Plasmaproben.

Man erkennt für die pH-Werte 8,25 und 8,75 zwei Maxima. Bei pH 8,25 ist das Maximum mit einer Zählausbeute von 8.500 cpm noch etwas höher als bei pH 8,75 mit einer Zählausbeute von 7.250 cpm. Für den optimierten Inkubationsansatz wurde daher ein Mercaptoethanol-Gemisch mit einem pH von 8.25 verwendet.

Die Catechol-O-Methyltransferase benötigt für die Methylierungsreaktion Metallionen als Cosubstrat. Infrage kommen die üblicherweise verwendeten Magnesiumionen und zweiwertige Manganionen. Wir haben deshalb eine Eichkurve im Bereich von 0 bis 10.000 pg Catecholaminzusatz/ml Plasma sowohl in Gegenwart von Mangan als auch Magnesium-Ionen gemessen (Abb. 43).

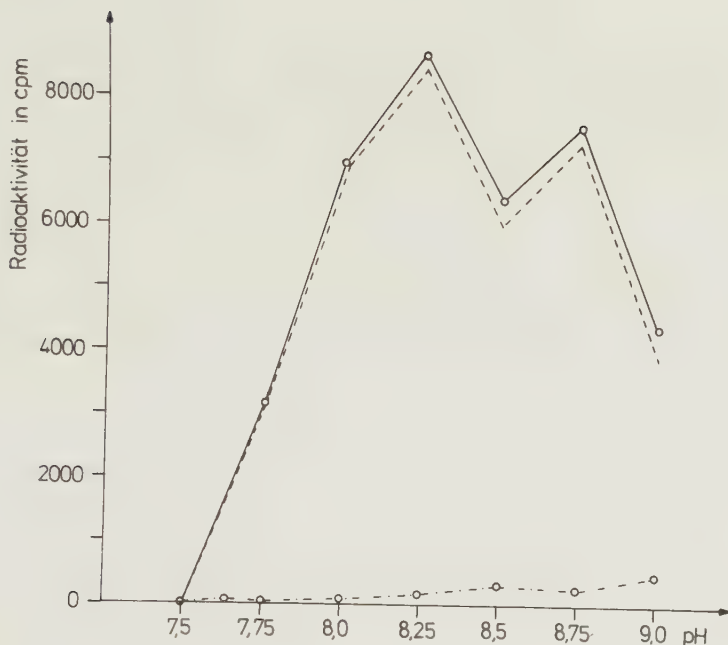


Abbildung 42:
Einsatz verschiedener pH-Werte des Inkubations-
ansatzes und daraus resultierende Radioaktivität
in Gegenwart vom Plasmaüberstand

- = gemessene Plasmakurve
- - - = Plasmakurve minus Leerwertkurve
- · - · = Leerwertkurve, gemessen durch Weglassung
von Plasmaüberstand und Catecholamin-
standard im Inkubationsansatz

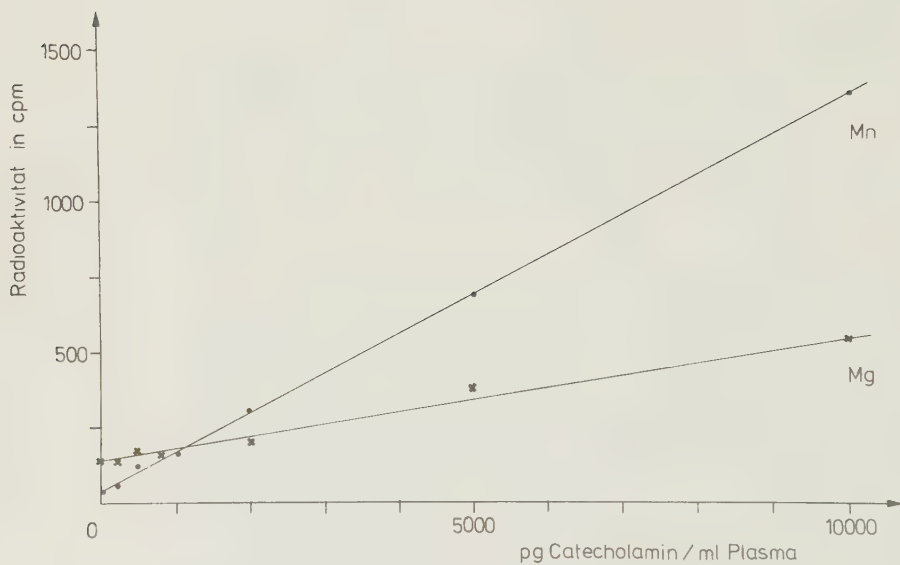


Abbildung 43:
Plasma-Additionseichkurve in Gegenwart von
Mangan- oder Magnesiumionen als Cosubstrat

Die besten Zählausbeuten wurden mit einer im Vergleich zur sonst üblichen Magnesiumchlorid-Konzentration um den Faktor 10 erhöhten Manganchlorid-Menge erzielt. Dieses Cosubstrat in der angegebenen Konzentration wurde für die weiteren Versuche eingesetzt.

Beim Vergleich der cpm-Ausbeuten wässriger Catecholamin-Standards gegen Standards in Anwesenheit von Plasma fiel eine deutliche Erniedrigung der Zählraten auf. Dieser Versuch erbrachte einen ersten Hinweis darauf, daß in Gegenwart von Plasma die Methylierungsreaktion inhibiert wird.

Der Standardzusatz von 10 ng Catecholamin/Ansatz ergab nur eine durchschnittliche Zählratenerhöhung von 300 cpm. Die gleiche Catecholaminmenge, gemessen als wässriger Standard, erzielte 20.000 cpm. Bei der Untersuchung von Plasma-proben ergaben sich ebenfalls derartig schlechte Zählausbeuten.

Aufgrund dieser Ergebnisse haben wir den Einfluß verschiedener Mengen des Überstandes der Eiweiß-fällung auf die Zählausbeuten systematisch untersucht. Hierzu setzten wir in sieben Ansätzen 0; 40; 60; 100; 200; 270 und 300 µl Plasma-überstand ein. Der Volumenausgleich im Inkubationsansatz wurde mit Perchlorsäure vorgenommen. Außer-

dem addierten wir zu jedem Ansatz 30 ng Adrenalin.

Wie die in Abbildung 44 gezeigte Kurve erkennen läßt, besteht bei einer Zugabe von 0 bis 200 μ l Plasmaüberstand in etwa ein lineares Absinken der Zählausbeuten. Bei 270 und 300 μ l Zugabe wird bereits fast die Zählrate des Leerwertes von 30 cpm erreicht. Diese Kurve zeigt eindeutig, daß in Gegenwart von Plasmaüberstand die Methylierungsreaktion beeinflußt wird.

Beim momentanen Erkenntnisstand ist nicht bekannt, welche Plasmabestandteile diese Inhibierung der Methylierungsreaktion verursachen. Ziel weiterer Forschungen müßte es sein, diese störenden Plasmabestandteile abzutrennen bzw. unwirksam zu machen und hiermit die Zählausbeuten des Verfahrens merklich zu erhöhen. Aufbauend auf diese Ergebnisse haben wir versucht, das Verfahren nach einer dünn-schichtchromatographischen Trennung (vgl. Kap. 2.3.4) auch zur differentiellen Analyse von Adrenalin und Noradrenalin heranzuziehen. Es zeigte sich jedoch wie bei obigen Untersuchungen, daß die resultierende Radioaktivität bei physiologisch im Blut vorkommenden Catecholaminmengen zu gering für eine Messung war. Für 10 ng Adrenalinzusatz/ml Plasma wurden lediglich 40 cpm, für die gleiche Menge Noradrenalin 15 cpm gemessen. Hierbei wurde mit den Proben die gesamte unter 2.3.5 beschriebene

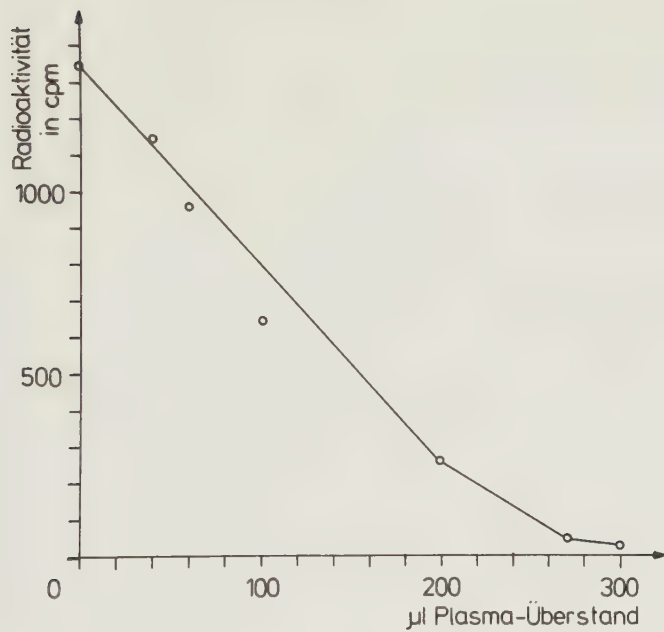


Abbildung 44:
Beeinflussung der Zählratenausbeute in Gegen-
wart verschiedener Mengen an Plasma-Überstand

Aufarbeitung unter Einbeziehung der Dünnschichtchromatographie ausgeführt. Derselbe Ansatz als Plasma-Leerwert und Additions-Eichpunkt von 10 ng Catecholamin/Ansatz ergab das in Abbildung 45 gezeigte Dünnschichtchromatogramm.

Für die quantitative Bestimmung der Plasma-Gesamtcatecholamine ist das oben beschriebene Verfahren leichter auszuführen als die Gesamt-Catecholaminbestimmung in der Modifikation nach PASSON u. PEULER (1973). Die analytischen Zuverlässigkeitskriterien können als zufriedenstellend bezeichnet werden. Hervorgehoben sei vor allem die hohe Linearität über den gesamten Meßbereich.

Eine Modifikation des Verfahrens auf die differentielle Analyse von Plasma-Adrenalin bzw. Noradrenalin ist uns nicht gelungen.

Das für die quantitative Bestimmung von Noradrenalin aus Plasma aufgeführte Verfahren (SCHIELE et al. 1978) unterscheidet sich von allen anderen bisher beschriebenen radioenzymatischen Methoden prinzipiell.

1. Es benutzt als katalytisch wirkendes Enzym die Phenylethanolaminmethyltransferase.
2. Es ist ausschließlich für die Bestimmung von Noradrenalin einsetzbar.

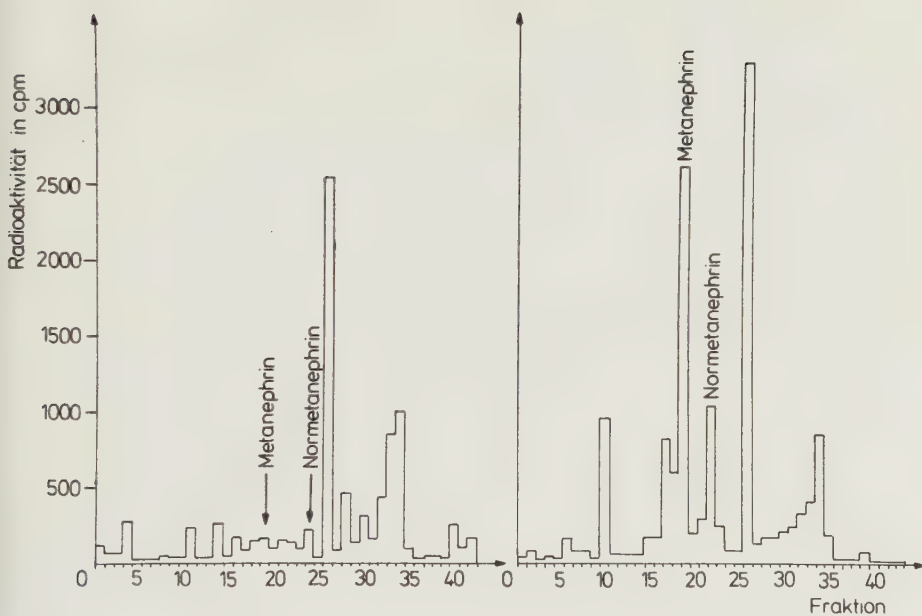


Abbildung 45:
Dünnschicht-Radiochromatogramme eines Plasmas
ohne (links) und mit Catecholamin-Zusatz (rechts)
von 10 ng/Ansatz

Voraussetzung für eine Durchführung der Methode ist, daß in der vorgegebenen Reaktionszeit das gesamte Noradrenalin der Probe zu Adrenalin methyliert wird. Dazu muß dem Inkubationsansatz PNMT-Lösung in ausreichender Menge zugesetzt werden.

Zur Bestimmung der optimalen Menge an Enzymlösung wurden zu 800 µl eines Normalplasmas 200 µl einer Noradrenalin-Standardlösung gegeben. Diese enthielt 20 ng NA/ml 0,01 N Salzsäure. Die Standard-Lösung stellten wir durch eine 1:50.000 Verdünnung der Arterenol[®]-Stammlösung her. Zu 1 ml Eichplasma wurden demnach 4.000 pg Noradrenalin addiert. Diese Noradrenalin-Konzentration wird nach unseren Erfahrungen auch in Plasmaproben von Personen während schwerer körperlicher Belastung nicht überschritten.

Diese Plasmaproben wurden auf ihre Noradrenalin-Konzentration unter Variation der Menge an eingesetzter PNMT-Enzymlösung untersucht. Wir verwendeten 10; 20; 30; 40 und 50 µl der Enzymlösung. In Abbildung 46 wird auf der Abszisse die Enzymmenge, auf der Ordinate die gemessene Radioaktivität aufgetragen. Die Kurve erreicht bereits bei 40 µl ein Plateau. Diese PNMT-Menge reicht aus, um das gesamte Noradrenalin der Probe zu methylieren. Für die vorliegende Enzympräparation wurde bei allen weiteren Ansätzen 50 µl PNMT-Enzymlösung eingesetzt.

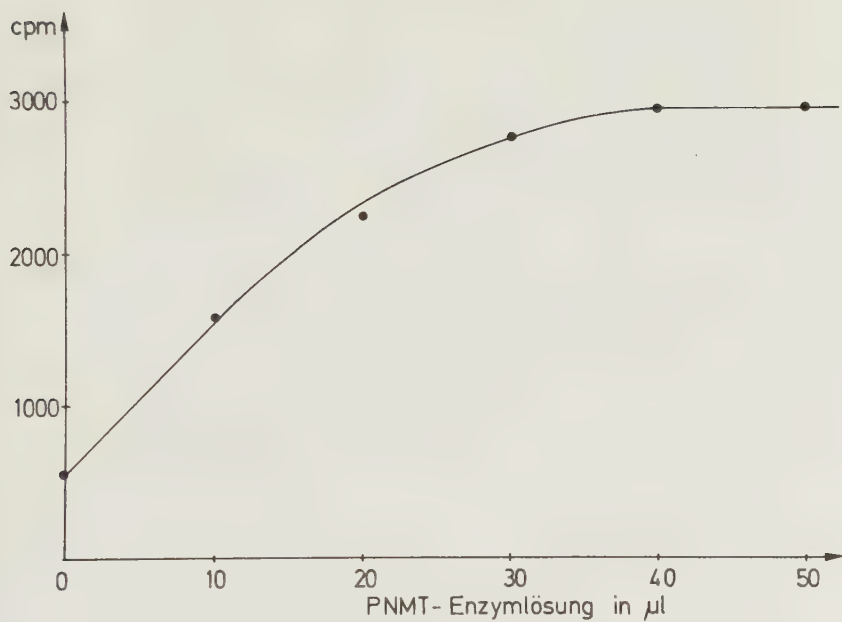


Abbildung 46:
Optimierung der Menge der einzusetzenden
Enzymlösung

Von den hier beschriebenen radioenzymatischen Catecholamin-Bestimmungsverfahren hat sich die Methode der quantitativen Bestimmung von Noradrenalin in Plasma als das zuverlässigste erwiesen. Dies ist insbesondere auf die Einführung der Doppelisotopenverdünnungstechnik als interne Standardisierung zurückzuführen. Es werden hierdurch alle Aufarbeitungsschritte nach der Inkubation automatisch nach ihren Wiederauffindungsraten korrigiert. Die Methylierungsreaktion kann durch dieses Verfahren nicht nach ihren Umsetzungsraten korrigiert werden.

Die Meßtechnik eines Flüssigkeits-Szintillationszählers besteht darin, daß einer bestimmten im Szintillator absorbierten Elektronenenergie eine analoge Impulshöhe am Ausgang des Sekundär-Elektronen-Vervielfachers entspricht. Daher sind bei konstanter Spannung am Elektronenvervielfacher die Impulshöhen einem bestimmten Energiespektrum der in dem Szintillator absorbierten β -Teilchen proportional. Bei geeigneter Verstärkung und Impuls-Diskriminierung, d.h. Ausblenden bestimmter Energiebereiche mittels einer unteren und oberen Energie-Schwelle, können in den nachfolgenden Zähler nur jene Impulse gelangen, deren Amplituden nach Verstärkung am Eingang des Impulshöhenanalysators zwischen dieser oberen und unteren Schwelle liegen. Diesen Energiebereich bezeichnet man deshalb als "Kanal" oder "Fenster".

Impulse, deren Höhe größer oder kleiner ist, werden nicht registriert. Unterscheiden sich zwei Strahler in der maximalen Energie mehr als um den Faktor 4-6, so können sie aufgrund der Pulshöhendiskriminierung gleichzeitig nebeneinander gemessen werden. Vor allem bei den energiearmen β -Strahlern wie Kohlenstoff-14 und Tritium besteht diese Möglichkeit.

Die β -Spektren erstrecken sich immer kontinuierlich von der Energie 0 bis zu einer für das Nuklid charakteristischen Maximalenergie. Es wird deshalb in dem Kanal, der das Nuklid mit der geringeren maximalen Energie mißt, immer auch ein gewisser Anteil aller höher energetischen Nuklide registriert.

In Abbildung 47 haben wir die Impulshöhenspektren von 3-H-Adrenalin und 14-C-Noradrenalin dargestellt. Das durch die Methylierungsreaktion entstandene 3-H-Adrenalin und das als interner Standard zugesetzte 14-C-Adrenalin wurden hierfür, um Quencheffekte zu berücksichtigen, getrennt nach 14-C und 3-H durch einen normalen Plasma-Bestimmungsansatz geführt.

Für die Aufnahme der Energiespektren bringt man sowohl den oberen als auch den unteren Energiebereich des Diskriminators auf die Stellung 0. In Schritten von 50 Skalenteilen wird dann die obere

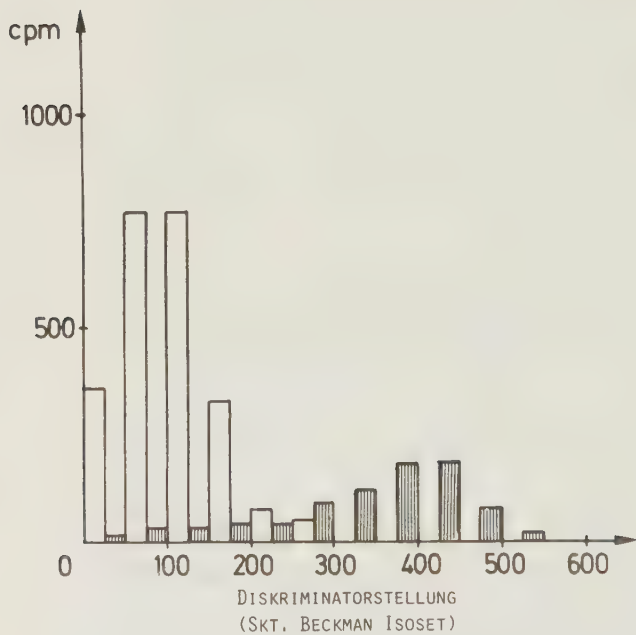


Abbildung 47:

Impulshöhenspektren von Tritium

¹⁴-C



und

Energieschwelle erhöht, während man die untere Begrenzung auf 0 beläßt. In Abbildung 47 ist die jeweilige cpm-Zunahme bei 3-H- bzw. 14-C-Markierung aufgezeichnet. Für die Impuls-Diskriminierung durch Ausblendung bestimmter Energiebereiche mittels der unteren und oberen Energieschwelle haben wir für die Messung des 14-C-Adrenalin-Standards den Bereich zwischen 350 und 500 ausgewählt. Für die Tritiummessung verwendeten wir den Diskriminator-Bereich zwischen 0 und 150. Er garantiert einerseits eine relativ niedrigere "Kreuzreaktion" des 14-C in den Tritiumkanal, andererseits wird die Ausbeute an Tritium nicht zu sehr verringert.

Bei der Messung von 10 verschiedenen 14-C-Adrenalin-Mengen in den Proben konnten wir zeigen, daß im Tritiumfenster durchschnittlich 11,47% der cpm-Zahlen des 14-C-Kanals vorliegen. Diese 11,47% müssen bei quantitativer Auswertung von den cpm-Zahlen des Tritium subtrahiert werden.

In Vorversuchen haben wir die optimale Menge des als interner Standard einzusetzenden 14-C-Adrenalins bestimmt. Für eine mittlere cpm-Ausbeute von 600 bis 800 cpm im 14-C-Kanal haben sich 50 µl der unter 2.3.3 beschriebenen 14-C-Adrenalin-Lösung bewährt.

Durch die Erweiterung des Noradrenalin-Bestimmungsverfahrens mit der Doppelisotopentechnik konnte eine Präzision in der Serie von 5,6% erreicht werden. Die Praktikabilität des Verfahrens ist aus dem hohen Probendurchsatz von 44 Analysen/Tag ersichtlich.

Zusammenfassend kann für alle radioenzymatischen Catecholamin-Bestimmungsverfahren gesagt werden, daß sie auf der einen Seite zwar die höchste Empfindlichkeit aufweisen. Auf der anderen Seite sind die Methoden, vor allem was die differentielle Analyse von Adrenalin und Noradrenalin betrifft, noch mit vielerlei Fehlermöglichkeiten behaftet. Diese erschweren vor allem den Einsatz im klinisch-chemischen Routinelaboratorium.

2.4 Der Nachweis der Catecholamine und einiger ihrer Metaboliten im Urin mit der Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie

2.4.1 Einleitung

Die HPLC hat sich in den letzten Jahren einen festen Platz im Instrumentarium analytischer Laboratorien erobert. Auch in der Klinischen Chemie wird diese vor ca. 10 Jahren entwickelte Trenn- und Nachweistechnik neuerdings eingesetzt (DIXON et al. 1976, GOSSLER et al. 1977). Gegenüber den bisher verwendeten chromatographischen Techniken wie Gas- und Dünnschicht-Chromatographie besitzt die HPLC einige entscheidende Vorteile. Hervorzuheben sind die kurzen Analysenzeiten und vor allem die schonenden Chromatographiebedingungen. So ist es z.B. möglich, mit der HPLC thermisch instabile Substanzen mit hohem Molekulargewicht zu untersuchen. Der Dampfdruck der nachzuweisenden Substanzen spielt keine Rolle, im Gegensatz zur Gaschromatographie. Entscheidend ist allein die Löslichkeit der Verbindungen.

Die Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie kann in den meisten Fällen in wässrigen Systemen ausgeführt werden. Damit wird der Übergang vom

biologischen Material in das Chromatographiesystem wesentlich erleichtert. In vielen Fällen ist es sogar möglich, Körperflüssigkeiten ohne weitere Aufarbeitung in den HPLC zu injizieren.

Biogene Amine wie die Catecholamine und ihre Metaboliten werden aus biologischem Material erst seit einigen Jahren mit der Flüssigkeitschromatographie nachgewiesen. Schwierigkeiten ergeben sich hierbei zum einen bei der chromatographischen Trennung. Wegen ihrer hohen Polarität kann man die Catecholamine und ihre Metaboliten nicht mit der Adsorptionschromatographie auftrennen. Dies gelingt erst seit der Einführung der Reversed Phase Chromatographie. Zum anderen war die Detektion der Substanzen in den unteren Konzentrationsbereichen bis vor kurzem nicht möglich. Die Catecholamine besitzen alle eine relativ niedrige UV-Absorption. Erst die Entwicklung hochleistungsfähiger Spektralphotometer und Spektralfluorimeter ermöglicht den Nachweis im Spurenbereich.

Neuerdings kann die quantitative Bestimmung der Catecholamine auch mit elektrochemischen Detektoren erfolgen. Diese Detektionssysteme benutzen zum Nachweis die Redox-Potentiale der Substanzen. Methoden wurden von den Arbeitsgruppen SHOUP u. KISSINGER (1977), KISSINGER et al. (1975),

RIGGIN et al. (1976), RIGGIN u. KISSINGER (1977), FELICE u. KISSINGER (1977), FENN et al. (1978), HALLMAN et al. (1978), MOYER et al. (1979), HANSSON et al. (1979) und MATUSSEK u. WELTER (1980) veröffentlicht.

Eine Vielzahl von HPLC-Methoden mit photometrischer und fluorimetrischer Detektion finden sich in der Literatur. Methoden für die Bestimmung der Plasma-Catecholamine beschrieben DAVIS et al. (1978) und für die Urin-Catecholamine KNOX u. JURAND (1976), UEDA et al. (1977), MELL u. GUSTAFSON (1977), IMAI u. TAMURA (1978), MELL et al. (1978), MELL u. GUSTAFSON (1978), SCHWEDT (1978) und GOSSLER u. SCHALLER (1978a). Für die Catecholamin-Metaboliten im Urin werden Verfahren von YOSHIDA et al. (1976a), YOSHIDA et al. (1976b), MITCHELL u. COSCIA (1978), FLOOD et al. (1979) und ROSANO u. BROWN (1977) aufgeführt.

Einige dieser Methoden erlauben es allerdings nur, Catecholaminspiegel in pathologischen Bereichen zu messen. Desgleichen weisen viele der Verfahren noch Unzulänglichkeiten hinsichtlich der analytischen Zuverlässigkeit und der Praktikabilität auf.

Wir haben deshalb versucht, empfindliche, spezifische und praktikable Analysenmethoden

zur Bestimmung von Catecholaminen und Metaboliten im Blut und Urin zu entwickeln. Versuche mit wässrigen Standardlösungen zeigten jedoch, daß die Nachweisgrenzen für die Plasmaanalysen nicht genügend niedrig liegen. Unsere Untersuchungen konzentrierten sich daher auf die Entwicklung von Verfahren zur Urinanalyse.

Besonderen Wert haben wir auf die Bestimmung der Vanillinmandelsäure, der Homovanillinsäure, der Vanillinsäure und von Adrenalin, Noradrenalin, Dopamin und Dopa gelegt.

2.4.2 Prinzip der Verfahren

Zur quantitativen Bestimmung der Vanillinmandelsäure, der Homovanillinsäure und der Vanillinsäure werden diese drei Substanzen vom angesäuerten Urin durch mehrmalige Extraktionen mit Essigsäuremethylester abgetrennt. In einer weiteren Vorreinigung entfernt man neutrale Substanzen der Urinmatrix durch eine Re-Extraktion der Catecholaminmetaboliten in eine alkalische Kaliumcarbonatlösung. Diese Lösung wird dann nach dem Ansäuern in den HPLC injiziert. Als chromatographisches Trennprinzip verwendet man die Reversed-Phase-Technik. Die Säulenfüllmaterialien sind Octadecylgruppen, welche an dem porösen Träger Kieselgel fixiert sind (Bürstenphasen). Die mobile Phase ist ein saurer Phosphat-

puffer, welcher Natriumsulfat zur Verbesserung der Peaksymmetrie enthält. Weiterhin wird dem Puffersystem Methanol beigemischt, um die Retentionszeiten für die Bestimmung der Homovanillinsäure und Vanillinsäure zu erniedrigen.

Die Detektion der im Milligramm-Bereich im Urin vorliegenden Catecholamin-Metaboliten erfolgt mit der UV-Spektroskopie in Verbindung mit einer Durchflußzelle von 8 µl Volumen.

Die Wellenlänge wird je nach Problemstellung auf 204 oder 275 nm eingestellt.

Die Probenvorbereitung für die quantitative Bestimmung von Noradrenalin, Adrenalin, Dopamin und Dopa aus Urinproben umfaßt zunächst eine Adsorption dieser Substanzen an Aluminiumoxid im "Batch-Verfahren". Catecholamine adsorbieren bei einem pH-Wert von 8.4 reproduzierbar und mit hohen Ausbeuten an Aluminiumoxid. Nach mehrmaligem Waschen des Aluminiumoxids desorbiert man die Catecholamine mit verdünnter Perchlorsäure. Die Eluate werden direkt in den HPLC injiziert.

Die chromatographische Trennung erfolgt auf Reversed-Säulen mit C₁₈-Materialien (5 µm).

Als mobile Phase verwenden wir 0,2 M Ameisensäure.

Die Detektion muß mit hochempfindlichen Spektralfluorimetern mit Xenonlampen zur Erzeugung der Anregungsenergie vorgenommen werden. Die Anregungswellenlänge von 282 nm und die Emissionswellenlänge von 315 nm liegen sehr eng beieinander. Daher sollten Geräte mit Doppelmonochromatoren zur Eliminierung von Streulichtanteilen eingesetzt werden.

2.4.3. Die quantitative Bestimmung von Vanillinmandelsäure, Homovanillin- säure und Vanillinsäure im Urin

2.4.3.1 Geräte und Chemikalien

vgl. Kap. 5.4.1, S. 244

2.4.3.2 Probenlagerung

vgl. Kap. 5.4.1, S. 245

2.4.3.3 Arbeitsvorschrift

vgl. Kap. 5.4.1., S. 245

2.4.3.4 Eichung

Die Eichung erfolgt auf der Basis von Urinverdünnungsreihen (vgl. Kap. 5.4.1, S. 247).

Die Aufarbeitung dieser Eichlösungen erfolgt analog der Arbeitsvorschrift.

In Abbildung 48 und 49 sind die Chromatogramme der aufgearbeiteten Urinproben einer Normalperson für die VMA und die HVA, VA-Bestimmung dargestellt.

Abbildung 50 zeigt die dazugehörigen Additions-Eichkurven.

2.4.3.5 Analytische Zuverlässigkeitskriterien der Methode

Bei der Bestimmung der Präzision in der Serie errechnen sich für die Vanillinmandelsäure-, Homovanillinsäure- und Vanillinsäure-Bestimmung Variationskoeffizienten von 4,3; 3,9 und 1,9%. Die für die Ermittlung der Richtigkeit eines Verfahrens wichtige Wiederauffindungsrate ergibt sich zu 89,5%.

Als Nachweisgrenzen ermittelten wir absolut gesehen 1 ng/Injektion für VA und HVA. Bei der VMA lag dieser Wert mit 0,3 ng/Injektion noch deutlich niedriger. Im biologischen Material waren die Nachweisgrenzen unter den gewählten Versuchsbedingungen bei ca. 1 mg/l Urin.

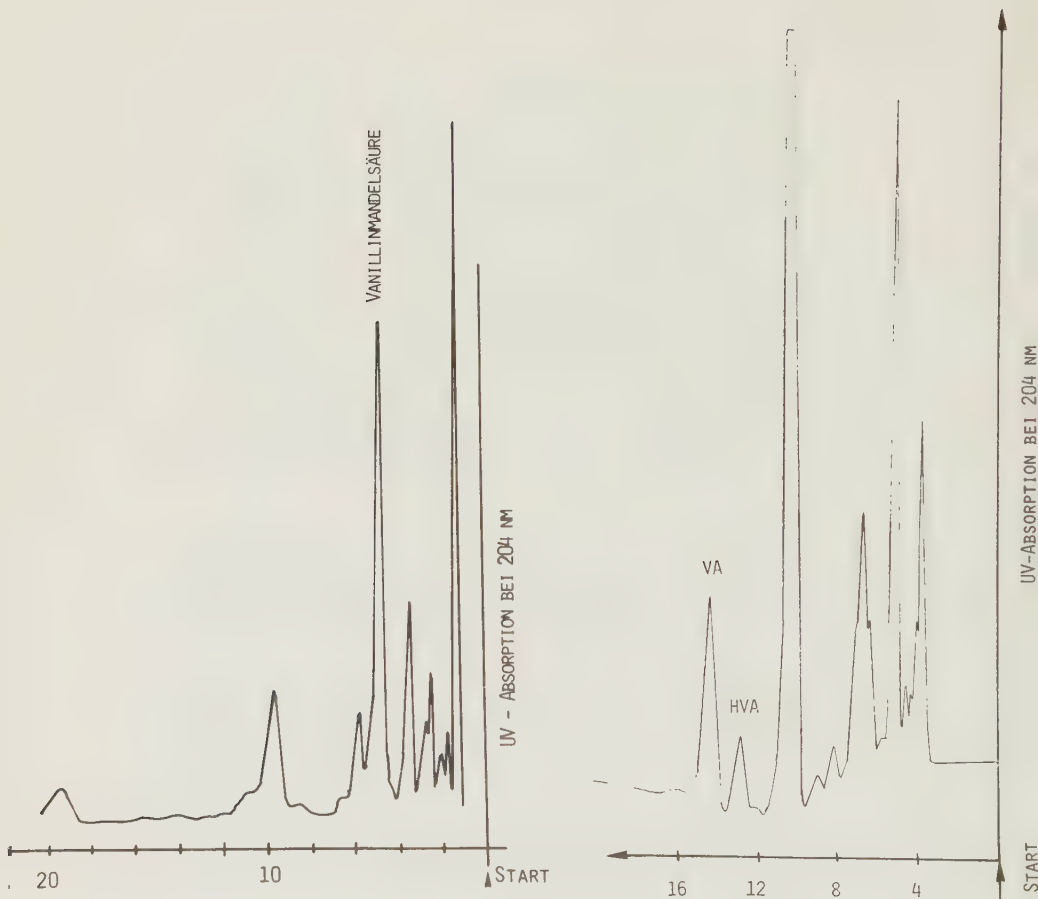


Abbildung 48 (links)
Chromatogramm des aufgearbeiteten Urinextraktes
einer Normalperson für die VMA-Bestimmung

Abbildung 49 (rechts):
Chromatogramm des aufgearbeiteten Urinextraktes
einer Normalperson für die HVA- und VA-Bestimmung

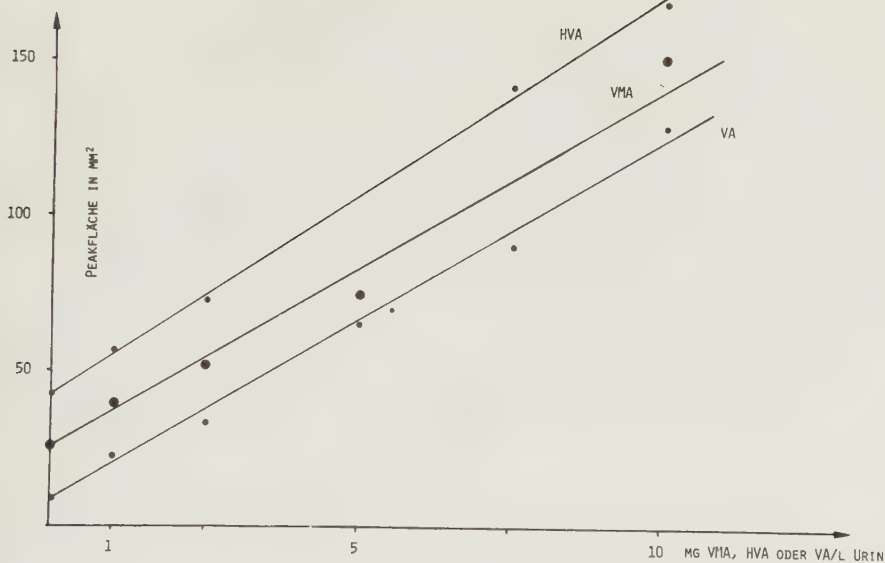


Abbildung 50:
 Additions-Eichkurven für die Vanillinmandelsäure-,
 Homovanillinsäure- und die Vanillinsäurebe-
 stimmung aus Urin

Das beschriebene Verfahren zeichnet sich durch eine ausreichende Praktikabilität aus. Eine Person kann pro Tag ca. 25 Urinalysen ausführen.

2.4.4 Die quantitative Bestimmung von Noradrenalin, Adrenalin, Dopamin und Dopa im Urin

2.4.4.1 Geräte und Chemikalien

vgl. Kap. 5.4.2, S. 247

2.4.4.2 Probenlagerung

vgl. Kap. 5.4.1, S. 245

2.4.4.3 Arbeitsvorschrift

vgl. Kap. 5.4.2, S. 248

2.4.4.4 Eichung

Zu Poolurin werden definierte Mengen an Adrenalin, Noradrenalin, Dopamin und Dopa zuge-mischt (vgl. Kap. 5.4.2, S. 250).

Die Aufarbeitung dieser Ansätze erfolgt wie angegeben. Die Chromatogramme der aufgearbeiteten Urinprobe einer Normalperson ohne und mit Catecholaminzusatz sind in Abbildung 51 und Abbildung 52 zu sehen. Die erhaltenen Eichkurven (Abb. 53) sind im angegebenen Bereich linear.

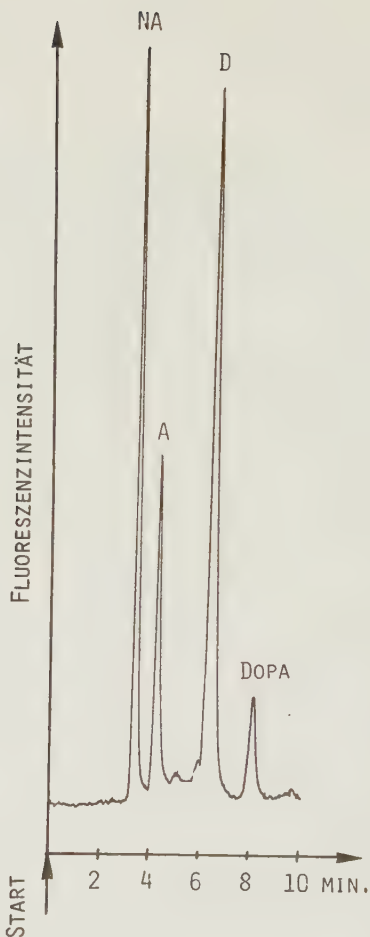
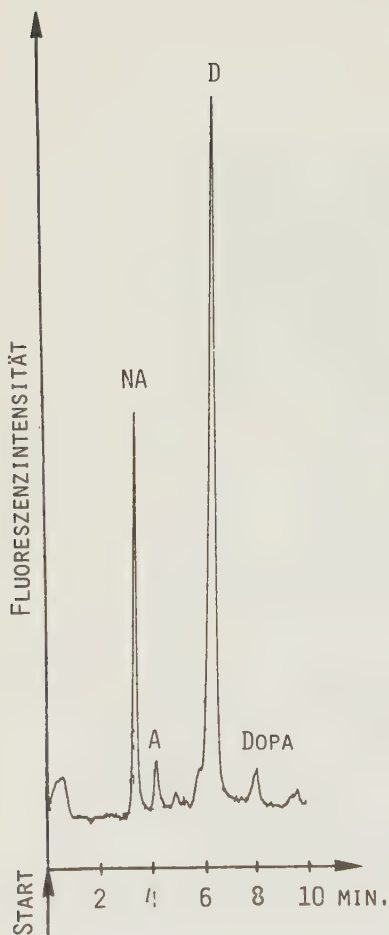


Abbildung 51 (links):

Chromatogramm der aufgearbeiteten Urinprobe einer Normalperson

NA: Noradrenalin, A: Adrenalin, D: Dopamin

Abbildung 52 (rechts):

Chromatogramm der aufgearbeiteten Urinprobe einer Normalperson unter Zusatz von jeweils 100 µg Catecholamin/l Urin

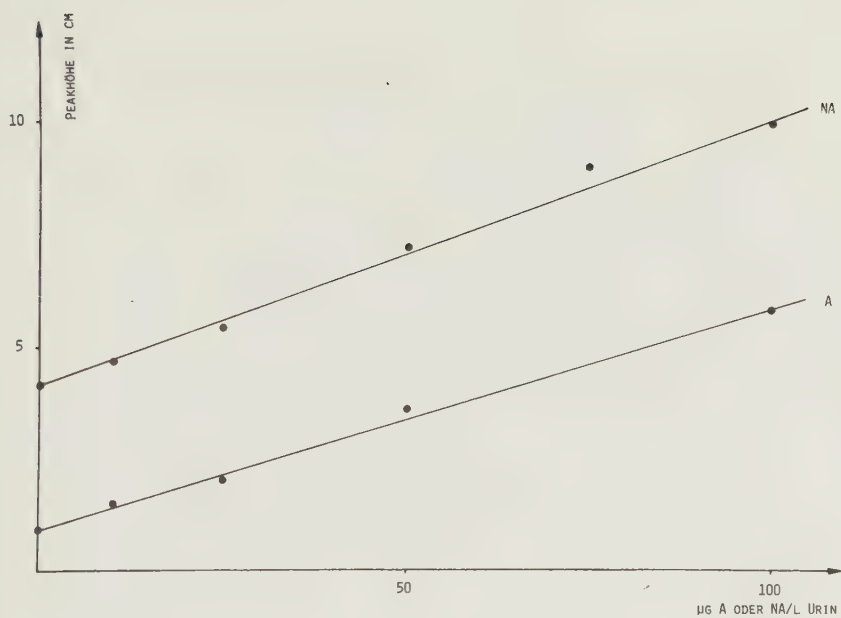


Abbildung 53:
Additions-Eichkurven für die Catecholaminbe-
stimmung im Urin

2.4.4.5 Analytische Zuverlässigkeitskriterien der Methode

Für die Präzision in der Serie ergaben sich bei der Messung von Urinproben mit Konzentrationen im Normalbereich für Noradrenalin, Adrenalin, Dopamin und Dopa Variationskoeffizienten von 5,6; 8,2; 2,0 und 14,0%. Die Nachweisgrenzen lagen bei Konzentrationen von 2,0; 5,0; 10 und 10 µg/l Urin.

Für die Wiederauffindungsraten konnten wir Werte zwischen 65 und 85% ermitteln. Eine Person kann mit dem angegebenen Verfahren 20 bis 30 Urinanalysen/Tag ausführen.

2.4.5 Diskussion

Ziel unserer chromatographischen Untersuchungen war es, praxismgerechte Verfahren für die Bestimmung der Catecholamine und ihrer Metaboliten im Urin zu erstellen.

2.4.5.1 Bestimmung der Catecholaminmetaboliten im Urin

Bei der Entwicklung einer geeigneten Proben-
vorbereitung für die Bestimmung der Catechol-
amin-Metaboliten Vanillinmandelsäure, Homo-

vanillinsäure und Vanillinsäure haben wir zunächst versucht, die Substanzen aus dem Harn durch Adsorption an Silica-Gel zu isolieren. Hierfür benutzten wir entsprechend den Angaben der Herstellerfirma die Fertigsäulen "Extrelut" (MERCK). Im Vergleich zur herkömmlichen Flüssig-Flüssig-Extraktion kann man mit Extrelut-Säulen für wässrige Standardlösungen von Vanillinmandelsäure, Homovanillinsäure und Vanillinsäure um ca. den Faktor 10 bessere Extraktionsausbeuten erzielen. Dieses Ergebnis ließ sich jedoch trotz Einsatz verschiedener Elutionsmittel (Essigsäureethylester, Dichlormethan, Toluol/Chloroform 4:1) und verschiedener pH-Werte der aufgegebenen Urinprobe nicht auf biologisches Material übertragen. Aus der Urinmatrix stammende störende Peaks ließen keinen spezifischen Nachweis der Catecholamin-Metaboliten zu.

Wir haben uns daher zur Probenvorbereitung für eine herkömmliche Flüssig-Flüssig-Extraktion entschieden. Zur Optimierung des Verfahrens wurden die Lösemittel Essigester, Dichlormethan und Toluol/Chloroform bei verschiedenen pH-Werten der Urinprobe getestet. Optimale Extraktionsausbeuten und Chromatogramme erhielten wir nach Zugabe von 100 µl 37%iger Salzsäure zu 10 ml Urinprobe mit dem Extraktionsmittel Essigsäureethylester. Eine weitere Ver-

besserung der Extraktionsausbeuten erbrachte die Zugabe von Kochsalz zum Urin.

Für die chromatographische Trennung testeten wir sowohl HPLC-Säulen mit Adsorptions- als auch mit Reversed-Phase-Eigenschaften.

Kieselgel als Säulenfüllmaterial und Elutionssysteme mit relativ unpolaren Lösemitteln retardieren die hochpolaren Catecholamine lange. Mit solchen Trennsystemen können keine Chromatogramme mit akzeptablen Retentionszeiten erhalten werden. Belegt man jedoch das Kieselgel mit einer Wasserschicht als stationäre Phase, so kann dieses System zur Bestimmung der Catecholamin-Metaboliten im Urin herangezogen werden. Der Trennmechanismus beruht dann auf Diffusionsvorgängen zwischen der stationären Phase Wasser und der mobilen Phase. Die Wasserschicht am Kieselgel wird ständig von der wassergesättigten mobilen Phase nachgeliefert. Als mobile Phase verwendet man den unpolaren Anteil eines 3-Komponenten-2-Phasensystems aus Dichlormethan, Ethanol und Wasser (MERZHÄUSER 1973).

In Abbildung 54 ist das Chromatogramm eines Normalurins und eines Urins mit einem Zusatz

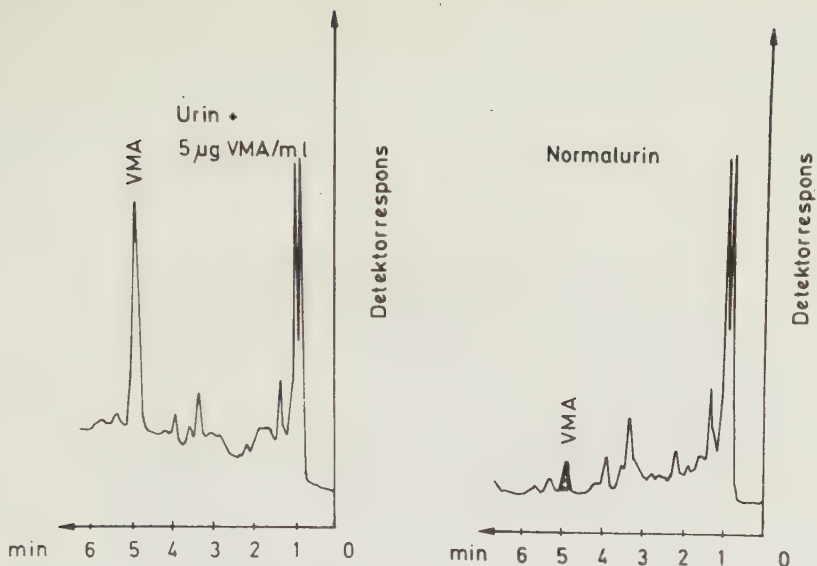


Abbildung 54: Chromatogramm des Extraktes eines Normalurins (rechts). Daneben (links) der gleiche Urin, welcher vor der Aufarbeitung mit 5 µg Vanillinmandelsäure versetzt wurde

Flüssigkeitschromatograph:	Spectra Physics, Modell 740
Detektor:	Spectra Physics, Modell SP 8200
Wellenlänge:	254 nm
Säulenfüllmaterial:	LiChrosorb Si 60 (Merck)
Teilchengröße: 7 µm	Säulenlänge: 250 mm
Innerer Säulendurchmesser:	4,6 mm
Säulentemperatur:	Raumtemperatur
Druck:	60 bar
Durchfluß:	1,4 ml/min.
Probenmenge:	10 µl
Proben-Lösemittel:	mob. Phase
Mobile Phase:	Unpolarer Anteil eines 3-Komponenten - 2-Phasen-systems aus Dichlormethan/Äthanol/Wasser nach Merzhäuser et al. (1973)
Funktion:	Linear

von 5 mg Vanillinmandelsäure/l Urin dargestellt. Die chromatographischen Bedingungen sind aus der Legende dieser Abbildung zu entnehmen.

Als problematisch erwies sich, daß dieses Trennsystem gegenüber Temperaturänderungen anfällig ist. Bereits relativ kleine Temperaturschwankungen veränderten die Retentionszeiten beträchtlich und erschwerten die Peakidentifikation. Außerdem stellte sich heraus, daß es sehr schwierig war, für dieses Trennsystem reproduzierbar Säulen zu füllen. Für den Routinebetrieb wirkten sich weiterhin die hohen Kosten negativ aus. Wir erarbeiteten daher eine Methode, welche für die Trennung die praktikableren Reversed-Phase-Materialien benutzt. Der wesentliche Vorteil der C_{18} -Phasen liegt in der Möglichkeit, wässrige Systeme als mobile Phase zu verwenden. Diese sind zum einen wesentlich preisgünstiger, zum anderen ist es bei der Aufarbeitung der Urinproben nicht notwendig, das wässrige System zu verlassen. Die hohe Säulenstabilität der RP- C_{18} -Materialien erwies sich bei der Messung größerer Serien als weiterer Vorteil. Die von uns nach der "high viscosity method" gepackten Trennsäulen mit kugelförmigen (sphärischen) Packungsmaterialien wurden nach der Füllung und im Laufe der

Betriebszeit mehrmals mit einem Testgemisch auf ihre Qualität überprüft. Als Testsubstanzen verwendeten wir ein Gemisch verschiedener "Parabene" und zwar die Methyl-, Ethyl- und Propyl-Ester der p-Hydroxybenzoesäure. Das Chromatogramm eines solchen Säulentestes ist in Abbildung 55 dargestellt.

Mit der für die Homovanillinsäure- und Vanillinsäure-Bestimmung beschriebenen mobilen Phase aus Phosphatpuffer, Methanol und Wasser lassen sich z.B. eine Vielzahl von Catecholamin-Metaboliten chromatographisch trennen. In Abbildung 56 bis 58 sind einige hochdruck-flüssigkeitschromatographische Trennungen von Standardlösungen gezeigt (50 µg Catecholamin-metabolit/ml mobile Phase).

Die Trennung eines Standardgemisches aus Vanillinmandelsäure, Homovanillinsäure und Vanillinsäure auf einer C₁₈-Säule (Fertigsäule Chrompack) mit einer Teilchengröße von 10 µm ist in Abbildung 59 dargestellt. Beim Einsatz dieser mobilen Phase zur Bestimmung aller drei Catecholaminmetaboliten im Urin stellte sich heraus, daß der Vanillinmandelsäurepeak in einer Vielzahl von Peaks aus der biologischen Matrix verschwindet. Die Homovanillinsäure und die Vanillinsäure wurden mit diesem

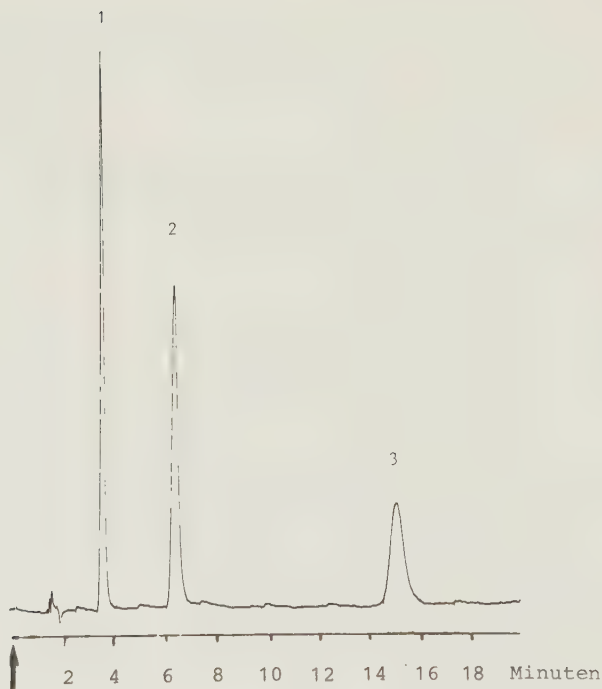


Abb. 55: Trennung eines Standardgemisches von p-Hydroxybenzoesäureestern (Parabenen) zur Säulentestung

- 1 (p-Hydroxybenzoesäuremethylester)
- 2 (p-Hydroxybenzoesäureethylester)
- 3 (p-Hydroxybenzoesäurepropylester)

Flüssigkeitschromatograph: Micromeritics Modell 7000
(Coulter Scientific, Krefeld)
 Schoeffel Spektralphotometer SF 770
 Wellenlänge: 254 nm
 Säulenfüllmaterial: Nucleosil C₁₈ (Macherey-Nagel & Co.)
 Trennprinzip: Reversed Phase
 Teilchengröße: 10 µm
 Säulenlänge: 250 mm
 Innerer Säulendurchmesser: 4,6 mm
 Säulentemperatur: Raumtemperatur; Druck: 210 bar
 Durchfluß: 2 ml/min. Probenmenge: 2 µl
 Probenlösemittel: mob. Phase
 Mobile Phase: Methanol/Wasser 1/1 (v(v))
 Funktion: linear

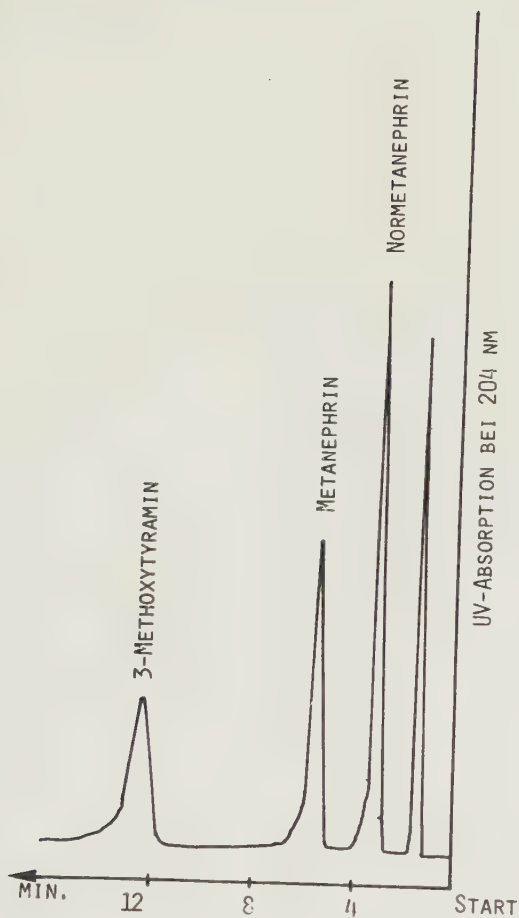


Abbildung 56:
HPLC-Trennung eines Standardgemisches aus Nor-
metanephrin, Metanephrin und 3-Methoxytyramin

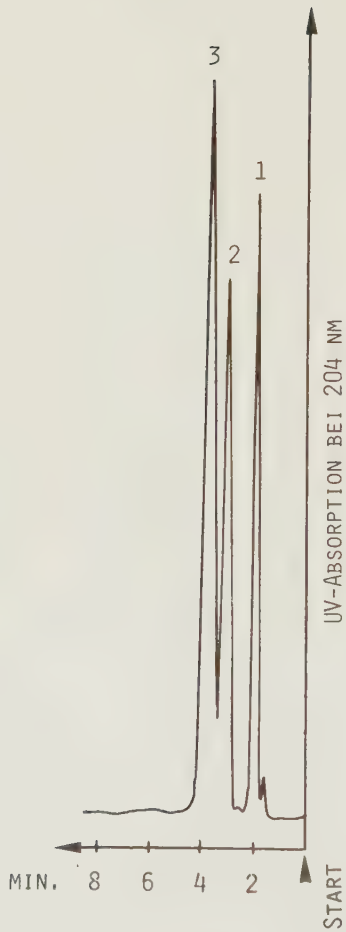


Abbildung 57:
HPLC-Trennung eines Standardgemisches aus
4-Hydroxy-3-Methoxyphenylmilchsäure (1), Phenol (2)
und 3,4-Dihydroxyphenyl- α -propylacetamid (3)

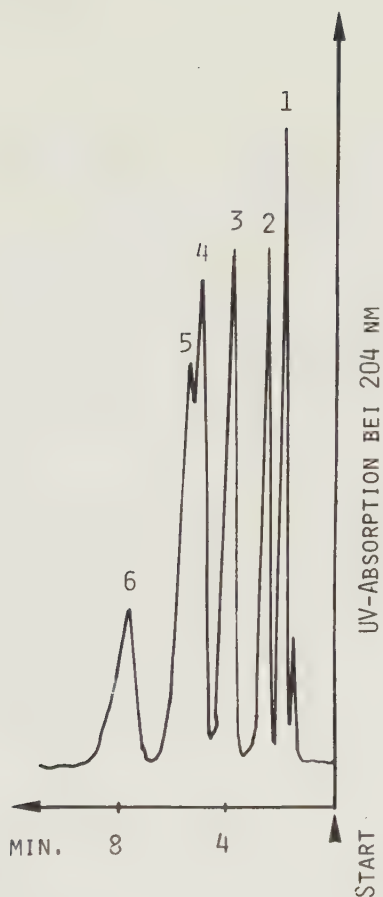


Abbildung 58:

HPLC-Trennung eines Standardgemisches aus
 3-Methoxytyrosin (1), 2-Methoxymandelsäure (2),
 2-Methoxyphenylelessigsäure (3), 2-Methoxybenzoe-
 säure (4), 3-Methoxyphenylelessigsäure (5) und
 4-Methoxybenzoesäure (6)

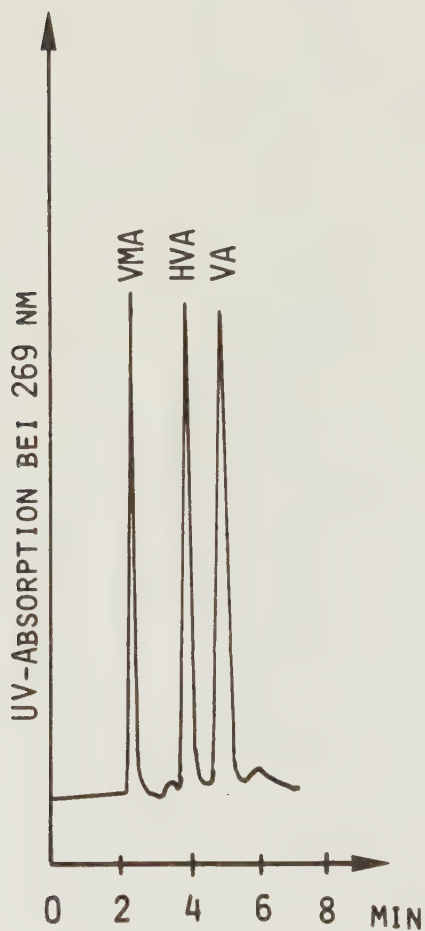


Abbildung 59:
HPLC-Trennung eines Standardgemisches aus
Vanillinmandelsäure, Homovanillinsäure und
Vanillinsäure

System jedoch gut abgetrennt. Zur Vanillinmandelsäure-Bestimmung mußten wir deshalb die Polarität der mobilen Phase erhöhen, um eine Spreizung der Peakfolge zu Beginn des Chromatogrammes zu erreichen. Ein 0,1 M Kaliumdihydrogenphosphatpuffer, pH 2.1, mit 1 M Natriumsulfat erwies sich als geeignetste mobile Phase für den Nachweis der Vanillinmandelsäure aus Urinproben.

Neben den Bedingungen der Probenaufarbeitung und der chromatographischen Trennung wurden von uns auch verschiedene Detektionswellenlängen optimiert. Grundlage dieses Vorgehens waren die von den drei Substanzen aufgenommenen UV-Spektren. Es zeigte sich, daß die Vanillin-säure ihr Absorptionsmaximum bei 217 nm neben kleineren Maxima bei 262 nm und 293 nm besitzt. Die Homovanillinsäure absorbiert maximal bei 201 nm und relativ gering bei 279 nm. Die Vanillinmandelsäure zeigt die höchste Absorption bei 204 nm und kleinere bei 231 und 278 nm. Man kann eine gute Nachweisempfindlichkeit für alle drei Substanzen bei einer Wellenlänge von ca. 204 nm erzielen. Diese relativ unspezifische Wellenlänge - in ihrem Bereich absorbieren fast alle organischen Substanzen - konnte bei der Vanillinmandelsäure und der Homovanillinsäure durch eine gemeinsame Wellenlänge

von 275 nm ersetzt werden. Für Vanillinsäure sollte eine spezifische und relativ empfindliche Wellenlänge von 251 nm gewählt werden.

Die erzielten Werte für die analytischen Zuverlässigkeitskriterien der erarbeiteten Methoden sind zufriedenstellend und erfüllen die Forderungen an eine Routinemethode im Bereich der klinischen Chemie. Die ermittelten Nachweisgrenzen reichen aus, um auch in Normalurinproben die verschiedenen Meßgrößen quantitativ zu erfassen. Durch Injektion größerer Proben volumina können die Nachweisgrenzen noch verbessert werden. Zur Überprüfung der Spezifität injizierten wir unter den jeweiligen HPLC-Bedingungen eine Vielzahl käuflich erhältlicher Catecholamine bzw. Metabolite. Wir konnten keine interferierenden Substanzen mit gleichen Retentionszeiten wie die der Vanillinmandelsäure, der Homovanillinsäure und der Vanillinsäure finden.

Zur Richtigkeitskontrolle stand uns ein käuflicher, lyophilisierter Kontrollurin für die klinische Chemie mit definiertem Vanillinmandelsäuregehalt zur Verfügung. Die HPLC-Analyse des Kontrollurins mit einer Konzentration von 14 ± 3 mg/l erbrachte in guter Übereinstimmung einen Wert von 12,5 mg VMA/l Urin. Zusätzlich wurden 17 Urinproben sowohl mit der HPLC als

auch mit der von PISANO et al. (1962) beschriebenen Methode auf ihren Vanillinmandelsäuregehalt analysiert. Mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,23 bestand kein statistisch absicherbarer Zusammenhang zwischen den mit beiden Verfahren erzielten Ergebnissen. Dies traf auch für den Vergleich der absoluten Werte zu. Die photometrische Methode lieferte durchwegs höhere Werte. Die mit der HPLC erhaltenen niedrigeren Werte deuten auf eine höhere Spezifität des von uns beschriebenen Meßverfahrens hin. Das von PISANO et al. (1962) publizierte Verfahren erscheint beim heutigen Erkenntnisstand nicht ausreichend zuverlässig zu sein.

2.4.5.2 Bestimmung der Catecholamine im Urin

Für die Isolierung der Catecholamine aus dem Urin mußten wir eine Optimierung der Probenaufarbeitung vornehmen. Vergleiche zwischen der Adsorption der Catecholamine an Aluminiumoxid im sog. "Batch"-Verfahren und der Ionenaustauscher-Chromatographie wurden vorgenommen. Es zeigte sich, daß das Aluminiumoxid die Chromatogramme mit dem niedrigsten Störuntergrund ergab. Die Wiederauffindungsraten dieses Aufarbeitungsschrittes lagen für Aluminiumoxidsauer oder neutral bei über 60%.

Für die chromatographische Trennung der Catecholamine eignete sich am besten eine Reversed-Phase-Säule mit einem spärlichen Füllmaterial der Partikelgröße 5 μm . Die Trennleistung von Säulen mit einer Partikelgröße von 10 μm genügte nicht, die im Urin vorliegenden Substanzen basisliniengetrennt nachzuweisen. Hinsichtlich Trennleistung und Durchlässigkeit der eingestrahlten Wellenlänge war als mobile Phase 0,2 M Ameisensäure die beste Lösung. Eine Standard-Trennung von Adrenalin, Noradrenalin, Dopamin und Dopa in wässriger Lösung ist in Abbildung 60 aufgezeigt.

Das Hauptproblem beim quantitativen Nachweis der Catecholamine im Urin stellt die notwendige hohe Empfindlichkeit bei der Detektion dar. Erste Versuche, die Catecholamine Adrenalin und Noradrenalin als Derivate des Essigsäureanhydrids zu bestimmen, scheiterten an den Nachweisgrenzen. Die beiden biogenen Amine wurden hierbei nach einem von MERZHÄUSER et al. (1973) beschriebenen Verfahren in wässriger Lösung in ihre Triacetylderivate übergeführt und diese dann flüssigkeitschromatographisch getrennt. Die Detektion und quantitative Bestimmung erfolgte mit einem UV-Detektor bei einer Festwellenlänge von 254 nm. Diese Methode wurde von

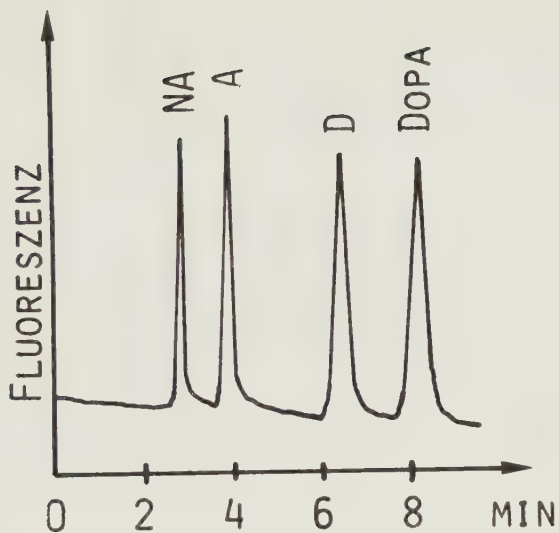


Abbildung 60:
HPLC-Trennung einer wässrigen Standardlösung
von Noradrenalin, Adrenalin, Dopamin und Dopa

uns nachgeprüft und das zugehörige Chromatogramm ist in Abbildung 61 zu sehen. Als Nachweisgrenzen ergaben sich für Adrenalin bzw. für Noradrenalin 100 ng pro Injektion. Aus diesen Angaben ist ersichtlich, daß mit der beschriebenen Methode eine Quantifizierung der Urin-Catecholamine wahrscheinlich nicht möglich ist.

Neben ihrer Absorption im UV-Bereich besitzen die Catecholamine auch eine sog. "native Fluoreszenz". Hierbei befindet sich die Anregungswellenlänge im Absorptionsmaximum des Durchlichtes bei ca. 275 bis 285 nm. Das Optimum der Emission haben wir mit hochauflösenden Spektralfluorimetern mit Doppelmonochromatoren zu 315 - 325 nm bestimmt.

Wie aus Abbildung 62 hervorgeht, liegen im Emissionsspektrum bei einer festen Anregungswellenlänge von 275 nm das Maximum der Fluoreszenz und die sog. Raman-Bande nahe beieinander.

Um Fluoreszenzmessungen der Catecholamine ohne den hohen Untergrund der lösemittelbedingten Raman-Bande durchführen zu können, muß die Spaltbreite des Spektralfluorimeters emissionsseitig so sein, daß keine Interferenzen auftreten können.

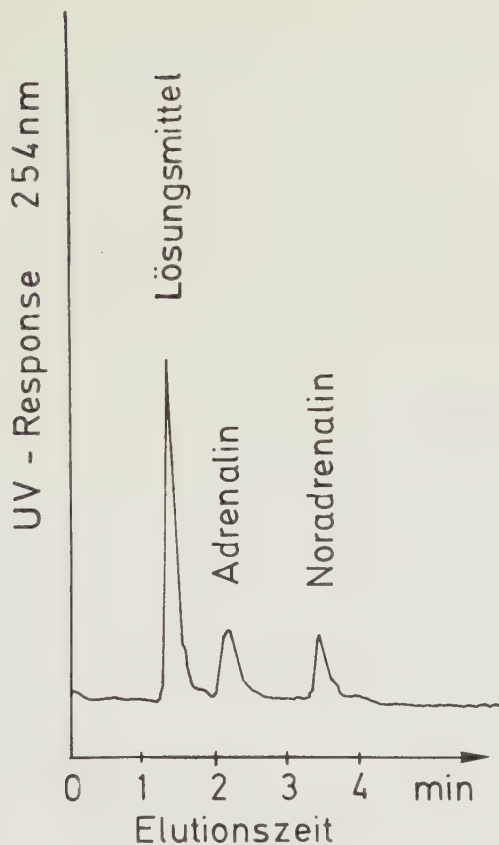


Abb. 61: HPLC-Trennung einer wäßrigen Standardlösung der Triacetylderivate von Adrenalin und Noradrenalin
Hochdruckflüssigkeitschromatographische Arbeitsbedingungen:

Flüssigkeitschromatograph:	Spectra Physics, Modell 740
Detektor:	Spectra Physics, Modell SP 8200
Wellenlänge:	254 nm
Säulenfüllmaterial:	LiChrosorb Si 60 (Merck)
Teilchengröße:	10 µm
Säulenlänge:	250 mm
Innerer Säulendurchmesser:	4,6 mm
Säulentemperatur:	Raumtemperatur
Druck:	56 bar
Durchfluß:	1 ml/min.
Probenmenge:	5 µl
Proben-Lösemittel:	Dichlormethan
Mobile Phase:	Unpolarer Anteil eines 3-Komponenten - 2-Phasensystems aus Dichlormethan/Äthanol/ Wasser nach Merzhäuser et al. (1973)
Funktion:	Linear

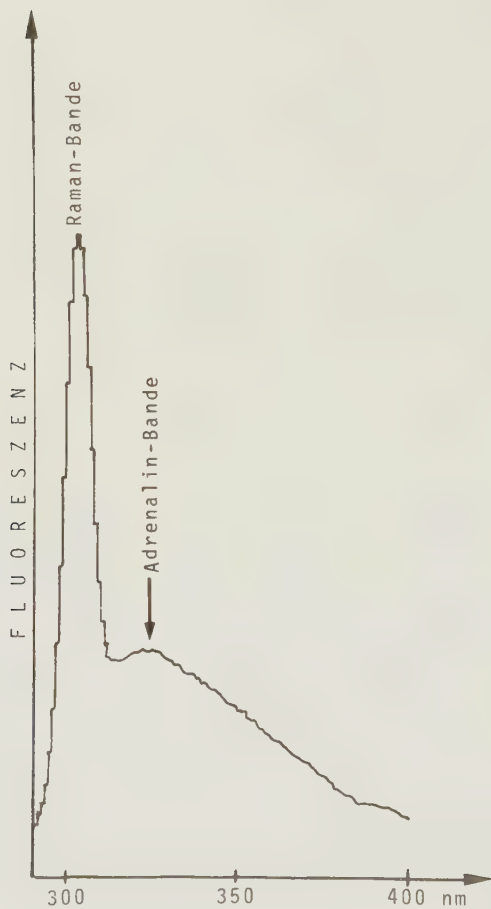


Abbildung 62:

Emissionsspektrum einer Lösung von 100 ng Adrenalin/ml Wasser. Anregungswellenlänge: 275 nm

Anregungs-Spalte: 8/8

Emissions-Spalte: 4/4

A: Range 10^0

B: Range 10^1

Spektralfluorimeter: SLM 8000 (Colora Lorch)

Wellenlängenoptimierung für die vier von uns chromatographisch getrennten Catecholamine ergaben die in Tabelle 11 aufgeführten Maxima.

	in nm	in nm
	λ A max	λ E max
Noradrenalin	282 - 283	314
Adrenalin	283	314
Dopamin	281 - 283	314 - 317
Dopa	279	314 - 316

Tabelle 11:

Anregungs- und Emissionsmaxima der Catecholamine, gemessen an Hand der Peakhöhen (HPLC-bedingungen wie in Kap. 2.4.4.3)

Vergleicht man die Nachweisgrenzen für wässrige Adrenalin- und Noradrenalin-Standardlösungen in der Quarzküvette im Durchlicht und in der Fluoreszenz, so erkennt man, daß die Fluoreszenzdetektoren für Adrenalin um den Faktor 10, für Noradrenalin sogar um den Faktor 100 empfindlicher sind (Tabelle 12).

NACHWEISGRENZEN IN DER KÜVETTE

PHOTOMETRIE (NG/ML)			FLUORIMETRIE (NG/ML)		$\lambda_A = 282; \lambda_E = 316 \text{ NM}$
ADRENALIN	10	(279 NM)	1		
NORADRENALIN	100	(279 NM)	1		

NACHWEISGRENZEN FÜR DIE HPLC

PHOTOMETRIE (NG/INJEKTION)		FLUORIMETRIE (NG/INJEKTION)	
ADRENALIN	1	0,05	
NORADRENALIN	10	0,1	

Tabelle 12:

Vergleich der Nachweisgrenzen in ng/ml wässriger Standardlösung für Adrenalin und Noradrenalin bei photometrischer und fluorimetrischer Detektion. Die Messungen wurden sowohl in der Küvette als auch unter HPLC-Bedingungen vorgenommen

In der gleichen Tabelle haben wir auch die Nachweisgrenzen von hochdruckflüssigkeitschromatographisch getrennten Adrenalin- und Noradrenalin-Standardlösungen aufgeführt (HPLC-Bedingungen wie unter 2.4.4.3 beschrieben). In diesem Falle erreichten wir bei Noradrenalin eine um den Faktor 20, beim Adrenalin eine um den Faktor 100 verbesserte Nachweisgrenze gegenüber der Photometrie.

Die analytischen Zuverlässigkeitskriterien des Verfahrens und die Nachweisgrenzen genügen den an einer Methode des klinisch chemischen Laboratoriums zu stellenden Anforderungen. Zur Überprüfung der Spezifität haben wir eine Vielzahl handelsüblich erhältlichlicher Catecholamin-ähnlicher Substanzen injiziert (Tabelle 13). Bei Peakinterferenzen wurde die Substanz dem Analysengang unterzogen. Unter Berücksichtigung der Trennleistung der Säule und der Probenvorbereitung konnten wir keine physiologisch vorkommende Verbindung entdecken, welche mit unserem Verfahren interferierte. Als weiterer Spezifitätstest diente die Aufnahme von UV- und Fluoreszenzspektren von Peakfraktionen. Auch hier konnte Übereinstimmung mit Standardlösungen festgestellt werden.

R_T - ZUSAMMENSTELLUNG VON CATECHOLAMINEN UND CATECHOLAMINÄHNLICHEN
SUBSTANZEN

SUBSTANZ	R _T
NORADRENALIN	2,82
ADRENALIN	3,67
DOPAMIN	5,54
DOPA	6,99
3-METHOXYTYRAMIN	14,43
NORMETANEPHRIN	4,52
METANEPHRIN	7,27
3,4-DIHYDROXYPHENYLALANIN (METHYLESTER)	23,80
TYRAMIN	8,51
3,4-DIHYDROXYPHENYL- α -PROPYLACETAMID	KEIN PEAK
TYROSIN	10,9
PHENYLAMIN	KEIN PEAK
3,4-DIHYDROXYPHENYLGLYCOL	5,94
3,4-DIHYDROXYBENZOE SäURE	27,16
3,4-DIHYDROXYPHENYLESSIGSÄURE	KEIN PEAK
3,4-DIHYDROXYMANDELSÄURE	5,04

Tabelle 13:

Aufstellung einiger Catecholamine und Catechol-
amin-ähnlicher Substanzen mit Retentionszeiten
bei den angegebenen chromatographischen Be-
dingungen

Eine Parallel-Analyse von 20 Urinproben mit dem beschriebenen fluorimetrischen Catecholamin-Bestimmungsverfahren (vgl. Kap.2.2, S. 70) für Adrenalin und Noradrenalin erbrachte mit einem Korrelationskoeffizienten $r = 0,36$ keine Übereinstimmung mit unserer hochdruckflüssigkeitschromatographischen Methode. Dies dürfte wiederum von der mangelnden Spezifität der ohne chromatographische Trennung ausgeführten Fluoreszenzreaktionen herrühren. Die durchwegs niedriger liegenden HPLC-Meßwerte deuten auf eine hohe Spezifität dieses Meßverfahrens hin.

Die in Urinproben von Normalpersonen gemessenen Adrenalin-, Noradrenalin-, Dopamin- und Dopa-Konzentrationen liegen ebenfalls unterhalb von den in der Literatur angegebenen Werten. Auch dies ist ein Beweis für die hohe Spezifität chromatographischer Meßverfahren bei der Analyse von biologischem Material.

3. SCHLUSSFOLGERUNGEN

Bei der quantitativen Bestimmung der Catecholamine und ihrer Metaboliten im biologischen Material müssen deren besondere chemische, biochemische und physikalische Eigenschaften Beachtung finden. Ihre Kenntnis und Berücksichtigung bei der Evaluierung und Durchführung der Analysenverfahren ist unbedingt Voraussetzung zum Erhalt zuverlässiger Analyseergebnisse.

Bisher ist in den vier Hauptkapiteln (2.1 bis 2.4) vorliegender Arbeit neben der Beschreibung der Analysenmethoden jeweils eine ausführliche Diskussion der Methodik vorgenommen worden. Abschließend sollen daher aus den gesamten experimentellen Erfahrungen und dem derzeitigen wissenschaftlichen Erkenntnisstand die wichtigsten Schlußfolgerungen gezogen werden. Dabei werden insbesondere die verschiedenen Analystechniken kritisch bewertet und dem Anwender die Vor- und Nachteile der verschiedenen Verfahren demonstriert.

Folgende wichtige Kriterien sind nochmals hervorzuheben:

1. Die Catecholamine und ihre Metaboliten sind chemisch relativ instabil und zeigen amphoter Verhalten. Es müssen deshalb spezielle

Verfahren für die Abtrennung dieser Substanzen aus dem biologischen Material erarbeitet werden.

2. Die Substanzklasse der Catecholamine ist durch ihre relativ kleinen strukturellen Unterschiede im chemischen Aufbau charakterisiert. Zur differentiellen Analyse dieser Verbindungen müssen daher spezifische und selektive Trennsysteme eingesetzt werden.
3. In den physiologischen Körperflüssigkeiten kommen die Catecholamine in sehr geringen Konzentrationen vor. Die niedrigen Spiegel im Urin, vor allem aber im Blut erfordern hochempfindliche Analysenverfahren. Der quantitative Nachweis der Catecholamine stellt hohe Ansprüche an die Detektionssysteme und erlaubt somit nur den Einsatz weniger Techniken.
4. Die physiologischen Konzentrationen der Catecholamine und ihrer Metaboliten im biologischen Material differieren in Abhängigkeit vom Untersuchungsmedium zum Teil erheblich. So liegen die Catecholamin-Konzentrationen im Urin im unteren $\mu\text{g/l}$ -Bereich. Die Catecholamin-Spiegel im Plasma befinden sich

dagegen im ng/l-Bereich. Die Catecholamin-Metaboliten im Harn weisen wiederum Konzentrationen in mg/l-Probenmaterial auf. Es müssen deshalb dem zu erwartenden Konzentrationsbereich und Probenmaterial angepaßte, oftmals unterschiedliche Analyseverfahren entwickelt werden.

Aus dem breiten Spektrum der modernen Analytik können zum Catecholamin-Nachweis insbesondere Analysetechniken wie Gaschromatographie, Spektralfluorimetrie, Radiochemie und Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie eingesetzt werden. Bei der Durchführung der vorliegenden experimentellen Arbeiten standen alle diese Verfahren zur Verfügung. Wir konnten dabei immer auf das modernste Instrumentarium zurückgreifen. Bei dieser Sachlage und unter Würdigung der Literatur kann folgendes Resümée gezogen werden:

1. Methoden zur quantitativen Bestimmung der Catecholamine in Blut und Urin mit der Gaschromatographie konnten nicht erstellt werden. Dies steht im Widerspruch zu einigen Literaturhinweisen. Unsere Versuche zeigten selbst bei Standardlösungen eine erschwerte Peakzuordnung, Neben- und Spaltprodukte bei der Derivatisierung, Instabilität der

Derivate gegenüber Hydrolyse und Stör-peaks aus Lösemitteln. Die gaschromatographischen Methoden erlaubten somit nicht einmal die Erstellung von Eichkurven mit wässrigen Standardlösungen. Auf eine Übertragung der Methoden auf das biologische Material wurde deshalb verzichtet. Eine quantitative Bestimmung der Catecholamine oder ihrer Metaboliten im biologischen Material mit der Gaschromatographie ist deshalb unserer Meinung nach nicht oder nur wenig geeignet.

2. Spektralfluorimetrische Methoden zur Bestimmung von Adrenalin und Noradrenalin im Harn sind unserer Meinung nach für Routineuntersuchungen geeignet. Die Vorteile dieses Verfahrens liegen in seiner hohen Praktikabilität. Als Nachteil muß gewertet werden, daß die Spezifität dieser Methoden beim Vergleich mit chromatographischen Verfahren speziell im unteren Meßbereich nicht ausreichend ist. Der Catecholamin-Nachweis im Plasma ist mit der Spektralphotometrie im physiologischen Bereich analytisch nicht zuverlässig. Bedingt ist dies durch eine ungenügende Empfindlichkeit dieses Detektorsystems.

3. Die radiochemischen Bestimmungsverfahren zeichnen sich durch die höchste Empfindlichkeit aus. Die Nachweisgrenzen liegen im Picogramm-Bereich. Diese Analysentechnik ist deshalb auch für den Nachweis der Catecholamine im Plasma zu empfehlen. Für die Bestimmung der Gesamt-Catecholamine wurden zwei unterschiedliche Verfahren für den Routineeinsatz erarbeitet. Eine weitere Methode kann zur spezifischen Bestimmung von Noradrenalin im Plasma verwendet werden. Für die differentielle Analyse von Adrenalin und Noradrenalin liegt uns derzeit noch kein ausgereiftes Analyseverfahren vor.
4. Die Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie kann für die quantitative Bestimmung der Catecholamine und einiger ihrer Metaboliten im Urin routinemäßig und analytisch zuverlässig eingesetzt werden. Als Vorteile der HPLC müssen die kurzen Analysenzeiten und die hohe Spezifität und Selektivität hervorgehoben werden. Eine nicht ausreichende Empfindlichkeit der in der HPLC verwendeten Detektionssysteme macht eine Übertragung dieser Methoden auf die Plasma-Analyse derzeit nicht möglich.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß Methoden für eine analytisch zuverlässige und praktikable Bestimmung der Urin-Catecholamine und deren Metaboliten vorhanden sind. Dies trifft auch zu für Verfahren zur quantitativen Bestimmung der Gesamt-Catecholamine und des Noradrenalins im Plasma. Die differentielle Analyse der Plasma-Catecholamine Adrenalin und Noradrenalin konnte nicht zu einem Routineverfahren ausgebaut werden. Aus den umfangreichen Untersuchungen lassen sich folgende methodische Empfehlungen in Abhängigkeit von der Meßgröße und dem Untersuchungsmedium geben (Tab. 14):

Untersuchungsmedium	Parameter	Analysenmethode
Plasma	Catecholamine	Radiochemie
	Metaboliten	---
Urin	Catecholamine	HPIC und Spektralfluorimetrie
	Metaboliten	HPIC

Tabelle 14:
Methodische Empfehlungen in Abhängigkeit von Meßgröße und Untersuchungsmedium für die quantitative Bestimmung von Catecholaminen bzw. Metaboliten in Plasma und Urin

Die Praktizierung dieser Methoden verlangt in jedem Falle speziell ausgestattete Laboratorien mit guter spektroskopischer und chromatographischer Instrumentierung und ein gut eingearbeitetes Personal. Nur dann lassen sich diese Methoden in der Routine analytisch zuverlässig und praxisgerecht durchführen.

4. Einsatz der Methoden in der Arbeitsmedizin anhand einiger Beispiele

Zur Bedeutung der Catecholamine in Plasma und Urin als Beanspruchungsparameter wurden zum einen Modellversuche im Labor unter exakt definierten Bedingungen und zum anderen Feldversuche am Arbeitsplatz vorgenommen.

In einem Modellversuch (SCHIELE et al. 1978) unterzogen sich 10 freiwillige Probanden psychischen und physischen Belastungen durch Rechentest und Fahrradergometrie bei intervallartig steigender Beanspruchung. Die psychische Belastung bewirkte keine Veränderung der Noradrenalin Spiegel. Wie Abbildung 63 zeigt, stiegen jedoch die Noradrenalin Spiegel (Median-Werte) im Blut in direkter Korrelation mit der Höhe der Ergometerbelastung an.

Ferner wurden einige Feldstudien durchgeführt. GOSSLER et al. (1978 b) haben die Catecholamin Spiegel bei 32 Offiziersanwärtern der Bundeswehr vor und nach einem Leistungsmarsch von 25 km gemessen. Die prozentualen Häufigkeitsverteilungen der Meßwerte für die Adrenalin- und Noradrenalinanalyse im Urin und für Noradrenalin im Plasma sind in Abbildung 64 dargestellt. Durch die Belastung, welche neben der physischen auch eine gewisse psychische Komponente enthält, kam es zu Erhöhungen der Noradrenalin Spiegel im Plasma und der Adrenalin- und Noradrenalin Konzentrationen im Urin.

Bei einer Untersuchung in einem Fernsehgerätekombi bestand das Kollektiv

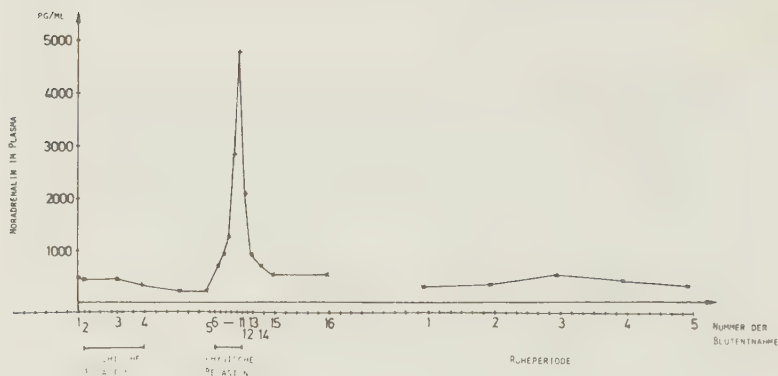


Abbildung 63:

Verlauf der Mediane der Noradrenalin-Konzentrationen am Belastungstag (Blutentnahmen 1-16; Rechen-test: 3 und 4; Fahrradergometer-Belastung: 7-11; Ruhewerte: 1; 2; 5; 6; 12-16) und am Ruhetag (Blutentnahmen 1-5, re.)

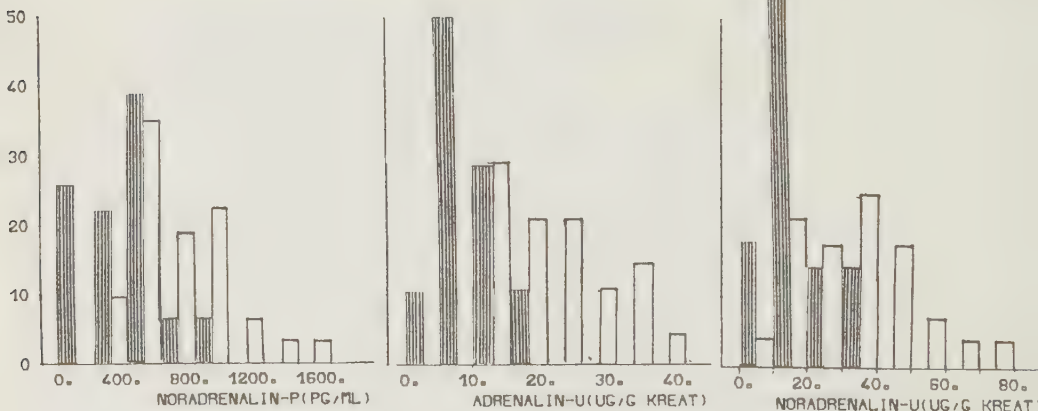


Abbildung 64:

Prozentuale Häufigkeitsverteilungen (Probandenzahl N=32) der Meßwerte von Noradrenalin im Plasma und von Adrenalin und Noradrenalin im Urin vor und nach der Belastung. Um diuresebedingte Schwankungen der Catecholamin-Konzentrationen auszugleichen, wurde eine Relativierung der Meßwerte auf das im Harn zeitkonstant

aus 35 Arbeiterinnen. 16 von ihnen arbeiteten an einem sog. kontinuierlich laufenden Band unter Vorgabe der Bandgeschwindigkeit. 19 Probandinnen waren an einem sog. Stopperband beschäftigt, bei dem durch Druck auf einen Fußschalter die Bandgeschwindigkeit individuell regelbar war. Die Probandinnen sammelten an zwei verschiedenen Tagen Urin. Am ersten Untersuchungstag fanden zusätzliche Blutentnahmen statt, welche nach unserer Meinung eine Stress-Belastung darstellen könnten.

Die Urinspiegel der Catecholamine bei den Probandinnen im Vergleich Stopperband - kontinuierlich laufendes Band zeigten keine signifikanten Unterschiede. Hingegen lagen die Ausscheidungsmengen von Adrenalin und Noradrenalin an den Tagen ohne Blutentnahme für die entsprechenden Zeitintervalle signifikant niedriger als an den Tagen mit Blutentnahme. Anstiege der Catecholaminkonzentrationen über den Arbeitstag sind an allen Versuchstagen festzustellen (Abb. 65).

Ferner wurden Studien bei Bundesbahn-Schnellfahrten, in einem Stahlwerk, in einer Munitionsfabrik und mit Prüfungskandidaten während des Physikums und unter Laborbedingungen durchgeführt.

Die Auswertung der Feldstudien erbrachte nicht so einheitliche Ergebnisse wie unsere Laborversuche. Dies kann vor allem damit erklärt werden, daß die Belastungsseite am Arbeitsplatz nicht so klar definierbar ist wie im Laborversuch und mannigfache Einwirkungen zu berücksichtigen sind. Es wird vor allem darüber diskutiert, auf welchen Ruwert eine Bezugnahme der sog. Belastungswerte stattfinden soll. Daneben ist durch wissenschaftliche Untersuchungen bisher noch nicht genügend abgeklärt, wie sich die Catecholaminspiegel im Blut und Urin während längerfristiger Stress-

belastungen über Wochen, Monate und Jahre verhalten. Ob in solchen Fällen eine Stabilisierung des hormonalen und vegetativen Systems stattfindet und sich diese im Basisbereich oder auf einem erhöhten Niveau einstellt, ist bisher nicht entschieden.

A / NA IN

µG/G KREATININ

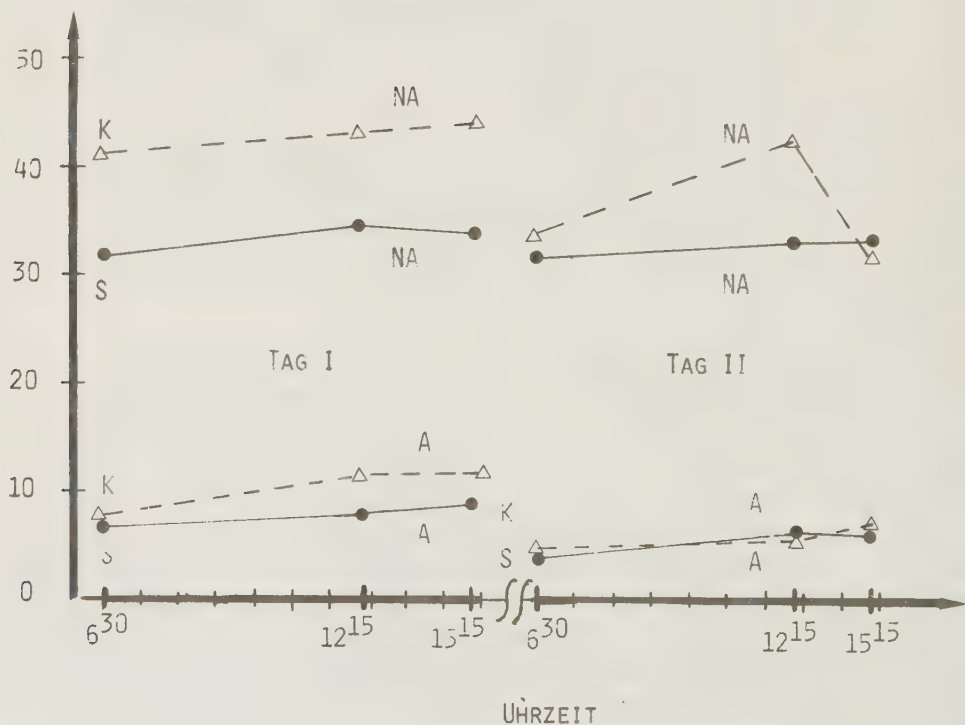


Abbildung 65:

Mediane der Adrenalin- und Noradrenalin-Ausscheidung (relativiert auf die Kreatininkonzentrationen) an den Meßtagen mit (I) und ohne (II) Blutentnahme. S: Stopperband, K: kontinuierlich laufendes Band

5. EXPERIMENTELLER TEIL

5.1 Versuchsbeschreibungen zur gaschromato- graphischen Bestimmung der Catecholamine

5.1.1 Geräte, Chemikalien

Geräte:

SHIMADZU 3 BE mit ^{63}Ni -ECD
PACKARD 409 mit ^{63}Ni -ECD

Chemikalien:

Alle nicht einzeln aufgeführten Lösemittel und Chemikalien waren von der Fa. MERCK in "pro analysi" Qualität.

Säulenfüllmaterialien (SERVA International)

Trifluoressigsäureanhydrid (MACHEREY-NAGEL u. Co.)

Monochlordifluoressigsäureanhydrid (ICN Pharmaceuticals)

Pentafluorpropionsäureanhydrid (Pierce Chemical Company)

Hexafluorbuttersäureanhydrid (MACHEREY-NAGEL u. Co.)

Trichloressigsäureanhydrid (Präparation nach BOREKEMA et al. 1958).

5.1.2 Methode für die Herstellung des
Adrenalin-Derivates

In einem Spitzkolben werden 1,83 g (0,01 Mol) Adrenalin in 50 ml abs. Tetrahydrofuran unter Rühren mit einem Magnetstäbchen suspendiert. Dann gibt man 10 g Trifluoressigsäureanhydrid (0,05 Mol) dazu. Es sollte sich im leichten Überschuß befinden. Man versieht den Kolben mit einem CaCl_2 -Trockenrohr und erwärmt eine halbe Stunde lang auf 40°C . Es entsteht eine klare Reaktionslösung. Das Tetrahydrofuran und die leichtflüchtigen Reaktionsprodukte werden am Rotationsverdampfer entfernt. Wegen der Empfindlichkeit der Reaktionsprodukte gegenüber Feuchtigkeit muß der Kontakt mit Luft möglichst vermieden werden. Das verbliebene dunkelgelbe Öl (Rohprodukt) wird in einer Mikroapparatur im Hochvakuum destilliert. Es geht ein farbloses, zähes Öl über ($\text{Kp}_{0,12}:135^\circ\text{C}$, $\text{Kp}_{760}:380^\circ\text{C}$).

Die Ausbeute beträgt 2,2g (39,8% der Th.).

$\text{C}_{17}\text{H}_9\text{F}_{12}\text{N}_7$ (567,18) Ber.: C 35,97 H 1,6 N 2,5
Gef.: C 36,32 H 1,6 N 2,5

5.1.3 Methode für die Herstellung des Noradrenalin-Derivates

Die Reaktion wird ähnlich wie beim Adrenalin ausgeführt. Wir setzen 1,69 g (0,01 Mol) Noradrenalin und 10 g Trifluoressigsäureanhydrid (0,05 Mol) ein. Die Hochvakuumdestillation ergibt ein zähes, hellgelbes Öl, $Kp_{0,12}:168^{\circ}\text{C}$ ($Kp_{760}:460^{\circ}\text{C}$). Die Ausbeute beträgt 2,0 g (36,2% d. Th.).

$\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{F}_{12}\text{NO}_7$ (553,23) Ber.: C 34,72 H 1,26 N 2,53
Gef.: C 35,70 H 1,34 N 2,62

5.1.4 Derivatisierung der Catecholamine mit Trifluoressigsäureanhydrid

10 mg Adrenalin bzw. Noradrenalin werden in 10 ml Tetrahydrofuran suspendiert. Man gibt 100 μl Trifluoressigsäureanhydrid hinzu und verschließt das Reaktionsgefäß. Unter Rühren wird 30 Minuten im Wasserbad auf 60°C erwärmt. Danach werden das Lösungsmittel, das überschüssige Trifluoressigsäureanhydrid und evtl. vorhandene leichtflüchtige Reaktionsprodukte am Rotationsverdampfer entfernt. Dies wird durch Anlegen eines Hochvakuums über einige Minuten unterstützt. Das Probenmaterial nimmt man dann in 10 ml absolutem Tetrahydrofuran wieder auf.

Für die gaschromatographische Analyse werden von dieser Stammlösung mit Tetrahydrofuran geeignete Verdünnungen hergestellt.

5.1.5 Gaschromatographische Bedingungen für die
Trennung der Trifluoressigsäureanhydrid-
Derivate mit der stationären Phase OV 17

Gaschromatograph:	SHIMADZU 3 BE
Detektor:	ECD
Säulen:	1/4" Glas; 2 m lang 2% Silicon OV 17 auf Chromosorb W-AW-DMCS, 80/100 mesh
Trägergas:	17 ml N ₂ /min.
Temperaturen:	
Einspritzblock:	250°C
Säule:	170°C
Detektor:	220°C

5.1.6 Gaschromatographische Bedingungen für
die Trennung der Trifluoressigsäure-
anhydrid-Derivate mit der stationären
Phase QF 1

Gerät:	PACKARD 409
Detektor:	ECD
Säule:	1/4" Glas, 3,25 m Länge 3% QF-1 auf Chromosorb G-AW-DMCS, 70/80 mesh
Trärgas:	30 ml Argon/Methan (90/10)/min.
Beimischung:	40 ml Argon/Methan (90/10)/min.
Temperaturen:	
Einspritzblock:	200°C
Säule:	170°C
Detektor:	250°C

5.1.7 Gaschromatographische Bedingungen für
die Trennung der Monochlordifluoressig-
säureanhydrid-Derivate mit der stationären
Phase OV 17

Gaschromatograph:	SHIMADZU 3 BE
Detektor:	ECD
Säule:	1/4" Glas, 2 m Länge 2% Silicon OV 17 auf Chromosorb W-AW-DMCS, 80/100 mesh
Trärgas:	17 ml N ₂ /min.
Temperaturen:	
Einspritzblock:	250°C
Säule :	220°C
Detektor:	300°C

5.1.8 Gaschromatographische Bedingungen für
die Trennung der Pentafluorpropion-
säureanhydrid-Derivate mit der stationären
Phase XF 1105

Gaschromatograph:	PACKARD 409
Detektor:	ECD (Ni 63)
Säulen:	1/4" Glas, 2 m Länge 1% XF 1105
Trärgasfluß:	30 ml Argon/Methan (90:10) Beimischung 60 ml Argon/Methan (90:10)
Temperaturen:	
Einspritzblock:	250°C
Säule:	170°C
Detektor:	220°C

5.2 Versuchsbeschreibungen zur spektral- fluorimetrischen Bestimmung der Catechol- amine in Urin und Plasma

5.2.1 Probenlagerung

Die Urinprobe wird unverzüglich mit je 1 ml
Eisessig/100 ml versetzt und bis zur Analyse
bei -20°C eingefroren.

5.2.2 Geräte und Chemikalien

Geräte:

Spektralfluorimeter FARRAND Mk 1 (KONTRON)
Flüssigkeits-Szintillationszähler LS 230 (BECKMAN)
pH-Meter (BECKMAN)
Quarzküvette (KONTRON)
Plastik-Einmalartikel aus Polypropylen

Chemikalien:

Alle Chemikalien sind - falls nicht anders ver-
merkt - in "pro analysi" Qualität von der Firma
MERCK bezogen.

Ionenaustauscherharze
Amberlite (SERVA International)
Dowex (SERVA International)
BIO-Rex (BIO RAD)

14-C-Adrenalin (Isotopen Dienst West)

Bray's solution

Wasser: Aus der Endstufe des Milli-RO und Milli-Q-
Systems der Firma Millipore entsprechend
einem vierfach quarzglasdestillierten Was-
ser

5.2.3 Arbeitsvorschrift für die Oxidation mit Kaliumhexacyanoferrat (III)

a) Noradrenalin-Bestimmung bei pH 6.5

1. Zu 2 ml Standardlösung in einem Reagenzglas
pipettiert man 1 ml 1 M Phosphatpuffer,
pH 6.5, 200 µl 0,25%ige Zinksulfatlösung
($\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) und mischt gut.
2. Man stellt sich ein Gemisch einer 2%igen
Ascorbinsäure-Lösung und 20%iger Natronlauge
im Verhältnis 2:9 (v:v) her.
Diese alkalische Ascorbinsäure-Lösung ist
nur ca. 20 Minuten lang haltbar und muß daher
vor jeder Testreihe frisch angesetzt werden!
3. In alle Reagenzgläser für die Leerwerte pi-
pettiert man 1 ml der alkalischen Ascorbin-
säure-Lösung und 200 µl 0,25%ige Kaliumhexa-
cyanoferrat-Lösung und mischt am Rührmixer.

4. In alle Reagenzgläser für die Probenwerte pipettiert man in Abständen von je 15 Sekunden 200 μ l 0,25%ige Kaliumhexacyanoferrat-Lösung und mischt gut, wobei sich die Lösungen leicht gelb färben. Genau 2 Minuten nach dieser Zugabe beginnt man mit dem Zusatz von 1 ml alkalischer Ascorbinsäure-Lösung, wiederum in 15 Sekundenintervallen.

b) Adrenalin-Bestimmung bei pH 3.5

Es werden wiederum je 2 ml Lösung für die Bestimmung eines Standard- bzw. eines Leerwertes verwendet. Die Arbeitsschritte erfolgen nach vorhergehender Vorschrift mit Ausnahme von Schritt eins. Anstelle des Phosphatpuffers wird bei diesem Arbeitsschritt 1 ml 1 M Acetatpuffer, pH 3.5 verwendet.

5.2.4 Konditionierungsmethoden für die Kationen-
austauscherharze

1. Konditionierung mit Phosphatpuffer:
Die Harze werden ca. 20 mal mit Wasser gewaschen und der Feinabrieb grob dekantiert. Um die Entstehung neuer Abriebteilchen zu vermeiden, wird das Rühren mit einem Glasstab vorgenommen. Magnetkerne sind nicht einzusetzen. Nach dem Spülen mit Wasser werden

die Harze zweimal mit 0,4 M Natriumphosphatpuffer pH 6.0 behandelt. Nach dem Einfüllen der Harze in Plastiksäulen wird nochmals mit Phosphatpuffer gespült. Die Säulen können dann direkt für die Catecholamin-Bestimmung benutzt oder verschlossen im Kühlschrank gelagert werden.

2. Konditionierung nach ENDEL u. HOLLMANN (1970):
Das Säulenfüllmaterial wird mit 2 M Natronlauge überschichtet, gerührt und die Flüssigkeit dann nach kurzer Zeit dekantiert. Dann wäscht man 3 mal mit Wasser nach. Ein weiterer Waschvorgang erfolgt mit 2 M Salzsäure. Anschließend wird wiederum 3 mal mit Wasser nachgewaschen.

Der nächste Waschvorgang erfolgt mit 0,1 M Phosphatpuffer, pH 6.5 (0,1% EDTA). Die abschließenden Waschvorgänge nimmt man 3 mal mit Wasser vor. Das Ionenaustauscherharz kann direkt in die Kunststoffssäulen eingefüllt werden.

3. Konditionierung nach SHOUP u. KISSINGER (1977):
Das Säulenfüllmaterial wird im Becherglas konsekutiv mit jeweils 250 ml 3 M Salzsäure, 3 M Natronlauge, 3 M Essigsäure, 1 M Ammoniumacetat pH 6.5 und 0,1 M Ammoniumacetat pH 6.5 unter ca. 15minütigem Rühren gewaschen. Für

die letzten zwei Waschvorgänge ist es notwendig, den pH-Wert von 6.5 nachzuprüfen. Die Kunststoffssäulen werden dann mit dem Säulenfüllmaterial, wie beschrieben, gefüllt. Die fertigen Säulen lagert man im Kühlschrank.

5.2.5 Analysengang zur Bestimmung der Adsorptionsraten verschiedener Kationenaustauscher

5 ml Adrenalin-Lösung mit einer Konzentration von 100 µg Adrenalin/l werden mit 15 ml 0,1%iger Na₂-EDTA-Lösung versetzt. Man stellt diese Lösung mit 0,5 M Natriumhydroxidlösung auf pH 6.5 ein und gibt dazu 20 µl einer Lösung von 14-C-Adrenalin in 0.1 M Essigsäure. Das Adrenalin hat die spezifische Aktivität 1 mCi/mM. Dies entspricht einer Menge von 180 bis 190 nM. Diese Mischung gibt man auf die Säule und läßt sie vollständig in das Harz einziehen. Das Eluat wird verworfen und die Säule 2mal mit je 10 ml Wasser nachgewaschen. Die Elution des Adrenalins vom Ionenaustauscher erfolgt durch Aufgabe von 8.5 ml 4%iger Borsäure. Das Eluat wird gesammelt und gemischt. Davon werden 1,5 ml mit 10 ml "Bray's Solution" in das Szintillationsröhrchen gegeben. Die Radioaktivität wird im Szintillationszähler gemessen.

5.2.6 Analysengang zur Bestimmung der Adsorptionsraten verschiedener Aluminiumoxide

Für die Versuche werden folgende Produkte verwendet:

Aluminiumoxid aktiv neutral (Aktivitätsstufe I)
für die Säulenchromatographie (MERCK)

Aluminiumoxid 90 aktiv sauer (Aktivitätsstufe I)
für die Säulenchromatographie (MERCK)

Aluminiumoxid aktiv basisch (Aktivitätsstufe I) für die Säulenchromatographie (MERCK)

Für die Bestimmung der Adsorptions- und Desorptionsraten dieser verschiedenen Aluminiumoxide werden jeweils 150 mg aktiviertes Aluminiumoxid zu 2 ml 0,5 M Natriumphosphatpuffer (pH 10) und 20 µl 14-C-Adrenalin in 0,1 M Essigsäure mit der spezifischen Aktivität 1 mCi/mM gegeben. Das entspricht einer Zugabe von 180 bis 190 mM Adrenalin und einer Zerfallsrate von 536.000 cpm. Man schüttelt ca. 5 Minuten und läßt das Aluminiumoxid sedimentieren. Dann hebt man den Überstand ab und verwirft ihn. Das Aluminiumoxid wird 3mal mit je 5 ml Wasser nachgewaschen. Dann eluiert

man mit 1 ml 0,1 M Perchlorsäure durch 1 Min. Schütteln. 20 µl des Eluates werden mit 10 ml "Bray's Solution" versetzt und die C-14-Aktivität im Szintillationszähler gemessen.

5.2.7 Arbeitsvorschrift für die Urin-Catecholaminanalyse über Adsorptionschromatographie an Aluminiumoxid

Zu 5 ml Standardlösung oder Urin gibt man 4 ml 5%ige EDTA-Na₂-Lösung und 1 ml einer frisch hergestellten 0,3%igen Ascorbinsäurelösung. Das Gemisch wird am pH-Meter auf einen pH-Wert von 8.4 eingestellt und in ein Becherglas, das 1 g Aluminiumoxid sauer enthält, übergeführt. Man rührt gründlich durch und läßt das Aluminiumoxid absetzen. Dann wird die überstehende Lösung abgehoben und verworfen. Anschließend muß das Aluminiumoxid 4mal mit jeweils 10 ml dest. Wasser nachgewaschen werden. Die Elution erfolgt mit 4 ml 4%iger Borsäurelösung. Die Endpunktsbestimmung entspricht dem in Kap. 2.2.3.3.1 angegebenen Verfahren.

5.3 Versuchsbeschreibungen zur radio-
chemischen Bestimmung der Catechol-
amine

5.3.1 Die analytische Bestimmung der
Gesamt-Catecholamine im Plasma
(VALENTIN et al. 1977)

5.3.1.1 Geräte, Chemikalien und Lösungen

Geräte:

Fortuna Pipettoren
Oxford-Macropipettoren (KONTRON)
Schüttelmaschine (GERHARDT)
Kühlzentrifuge (HERAEUS-CHRIST)
Szintillationszähler LS 230 (BECKMAN)
Plastik-Einmalartikel aus Polypropylen

Chemikalien:

Adrenalin, Noradrenalin (FLUKA)
Liquifluor (N.E.N.)
Aquasol (N.E.N.)
3-H-SAM (4 Ci/mmol) (N.E.N.)
14-C-SAM (55 mCi/mmol) (N.E.N.)
3-H-Noradrenalin (5 Ci/mmol) (N.E.N.)
3-H-Adrenalin (10 Ci/mmol) (N.E.N.)
Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan (THAM) (MERCK)

Normetanephrin (FERAK bzw. KK-Lab.)

Metanephrin (KK-Lab.)

Reduziertes Glutathion (GSH) (MERCK)

Alle nicht aufgeführten Chemikalien sind von der Firma MERCK in p.A.-Qualität

Lösungen:

Es wird für alle Lösungen Aqua bidest. verwendet.

Toluol/Isoamylalkohol (3:3 v/v)

4 M Ammoniak

3%ige Essigsäure

80 mM Tris-Puffer (pH 8.2):

Man löst 12,1 g Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan in etwas Wasser und stellt den pH-Wert mit Salzsäure auf 8,2 ein und füllt auf 100 ml Lösung auf.

GSH-Lösung:

Man löst 15,4 mg GSH in 10 ml Wasser

24 mM Magnesiumchlorid-Lösung:

Man löst 610 mg $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ in 10 ml Wasser

0,22 mM Pargyline-Lösung:

Man löst 55 mg Pargyline $\cdot \text{HCl}$ in 100 ml Wasser

3-H-SAM-Lösung:

Es sollen bei jedem Ansatz 2,5 μCi 3-H-SAM eingesetzt werden. Dazu werden 250 μCi des Handelspräparates mit 10 ml unmarkierter SAM-Lösung verdünnt. Diese stellt man durch Lösen von 6,2 mg $\text{SAM} \cdot \text{HSO}_4$ in 100 ml verdünnter Schwefelsäure (pH ca. 2.0) her. Die 3-H-SAM-Lösung wird bei -20°C in der Tiefkühltruhe aufbewahrt.

1 M Boratpuffer (pH 11.0):

6,2 g Borsäure werden in etwas Wasser gelöst und mit 6 M NaOH auf pH 11.0 eingestellt. Dann füllt man auf 100 ml auf.

Carrier-Lösung:

Jeweils 0,5 mM Metanephrin bzw. Normetanephrin pro 20 μl

Man löst 5,8 mg Metanephrin $\cdot \text{HCl}$ bzw. Normetanephrin $\cdot \text{HCl}$ in 1 ml Wasser auf.

Präparation der Catechol-O-Methyltransferase (COMT) aus Rattenlebern

Chemikalien und Lösungen:

Isotonische Kaliumchloridlösung (1,2 g $\text{KCl}/100 \text{ ml } \text{H}_2\text{O}$)

1 M Essigsäure (60 g Eisessig/l H_2O)

Ammoniumsulfat p.a.

0,001 M Phosphatpuffer (pH 7.0):

364 mg Dinatriumdihydrogenphosphat $\times H_2O$ und

324,9 mg Natriumhydrogenphosphat ad 5 l Wasser.

2 M Tris $\times Cl$ - Puffer (pH 8.2):

121,1 g Tris bzw. 157,55 g Tris $\times Cl$ werden

in Wasser gelöst, mit NaOH-Lösung auf pH 8.2

eingestellt und auf 1 l aufgefüllt.

Arbeitsvorschrift:

Die Ratten werden narkotisiert, getötet und die Lebern möglichst schnell entnommen und in flüssiger Luft gelagert.

Alle weiteren Aufarbeitungsschritte führt man zwischen 0 und 5°C durch. Es wird immer Aqua bidest. verwendet!

Etwa 100 g der Lebern werden mit 100 ml isotonischer Kaliumchloridlösung mit dem Turbo-mix homogenisiert und bei 78.000 g 30 Min. lang zentrifugiert. Man hebt mit Pasteur-Pipetten den Großteil der überstehenden Lösung (ca. 320 ml) ab und stellt mit 1 M Essigsäure auf pH 5.0 ein. Nach 10 Min. Rühren zentrifugiert man erneut ab (ca. 30.000 g). Zu 300 ml des Überstandes gibt man unter Rühren 52 g Ammoniumsulfat (Sättigung: 30%). Der Niederschlag wird verworfen und zu der überstehenden Lösung erneut 34 g Ammoniumsulfat gegeben (Sättigung: 50%).

Nach Zentrifugation und Verwerfung der wässerigen Phase wird der Niederschlag in 50 ml Wasser gelöst, wobei man eine klare Lösung erhält. Dann dialysiert man 6 Stunden lang gegen einen 0,001 M Phosphatpuffer (pH 7.0) (Dialyseschlauch gründlich mit Puffer auskochen, nicht mit bloßen Händen anfassen!). Der bei der Dialyse ausfallende Niederschlag wird abzentrifugiert (30.000 g) und dann die Lösung mit 2 M Tris-Puffer (pH 8.2) auf pH 8.1 eingestellt. Die Enzympräparation wird in aliquoten Teilen bei -20°C eingefroren und ist, wie eigene Messungen zeigten, mindestens 3 Monate lang stabil. Mehrmaliges Auftauen ist zu vermeiden.

Eigenschaften einer Enzympräparation (Beispiel):

COMT-Präparation vom 10. Juni 1975:

Es wurden 10 junge Ratten getötet. Einwaage an Lebern 70 g. Nach Essigsäurefällung: 57 ml Lösung. Am Ende der Aufbereitung hatten wir 23,5 ml Enzympräparation erhalten. 100 µl dieser Präparation wurden einer COMT-Aktivitätsbestimmung unterzogen, wobei sich eine gemessene Radioaktivität von 104.500 cpm bei einem Leerwert von 1.300 cpm ergab. Dies entsprach einer Aktivität von 9,3 U/l.

Herstellung der Catecholamin-Standard-
Lösungen:

Man löst unter Zugabe von 20 µl 25%iger Salzsäure 10 mg Catecholamin in 100 ml Wasser und stellt drei 1:100 Verdünnungen her. Die Endkonzentration beträgt dann 1 ng Catecholamin/ml oder 1 pg/µl (= 0,0054582 pM). Diese Lösungen sind jeweils frisch anzusetzen.

5.3.1.2 Probennahme und Probenlagerung

10 ml Blut werden durch Venenpunktion entnommen und in ein Zentrifugenröhrchen überführt, das bereits 200 µl Heparinlösung (Vetren®) und 15,4 mg (entsprechend einer Endkonzentration von 5 mM) reduziertes Glutathion enthält. Nach vorsichtigem Umschütteln kühlt man die Probe sofort ca. 10 Minuten lang im Eiswasser. Das Plasma wird mit Hilfe einer Kühlzentrifuge bei +4°C getrennt, schnell tiefgefroren und auf Trockeneis bei -78°C gelagert.

Diese Arbeitsschritte müssen wegen der hohen
Instabilität der Catecholamine in möglichst
kurzer Zeit vorgenommen werden.

5.3.1.3 Arbeitsvorschrift

Die Inkubationsschritte werden als Zeitreaktion in 13 ml Zentrifugenröhrchen aus Polyethylen mit Polyethylenstopfen ausgeführt. Das Gesamtvolumen von 1.250 μ l setzt sich zusammen aus:

- a) 50 μ l Tris-Cl-Puffer
- b) 500 μ l GSH-Lösung
- c) 100 μ l Magnesiumchloridlösung
- d) 100 μ l Pargylinelösung
- e) Wasser zum Volumenausgleich
- f) 100 μ l 3-H-SAM-Lösung
- g) Plasma bzw. Standardlösungen

Zur Messung der Plasmaproben werden 100 μ l Plasma eingesetzt. Bei der Erstellung der Eichkurve werden Volumina von 50, 100, 150, 200 und 300 μ l der Catecholaminstandardlösung pro Reaktionsansatz eingesetzt. Dies entspricht einer Menge von 50, 100, 150, 200 und 300 pg (0,273; 0,546; 0,819; 1,092; 1,637 pMol) Catecholamin. Zur Erstellung eines Leerwertes wird anstatt von Plasma bzw. Catecholamin-Standardlösung Wasser eingesetzt.

- h) 100 μ l der COMT-Präparation

Die Reaktion wird als Zeitreaktion in 30 Sec.-Abständen durch Hinzufügen von 100 μ l der COMT-Lösung gestartet. Man inkubiert bei 37°C eine Stunde lang. Die Reaktion stoppt man dann mit 100 μ l M Borat-Puffer (pH 11.0) ab und fügt dem Reaktionsansatz 200 μ l Carrier-Lösung zu.

Zu diesen Ansätzen pipettiert man dann 11 ml des Toluol/Isoamylalkohol-Gemisches (3:2) und extrahiert 15 Min. lang. Die Röhrchen werden 5 Min. zentrifugiert und mit einem Oxford-Macropipettor pipettiert man 10 ml der überstehenden organischen Phase in einen 100 ml Rundkolben. Nun wird am Rotationsverdampfer zur Trockene im siedenden Wasserbad eingedampft. Auf gründlichste Entfernung von Lösungsmitteln ist zu achten, da in einer Nebenreaktion bei der enzymatischen Umsetzung 3-H-Methanol entstehen kann. Dann nimmt man den Rückstand in 4,5 ml 2 M Ammoniak auf. Um eine gute Wiederauflösung der Rückstände zu ermöglichen, läßt man 15 Min. lang stehen, wobei immer wieder geschüttelt wird. Eventuell kann man etwas erwärmen.

Zur Durchführung der Vanillinoxidation wird die Lösung in einer Zeitreaktion mit 500 μ l 3%iger Natriumperjodatlösung bei 37°C für

10 Min. inkubiert. Dann fügt man 1 ml 10 M Essigsäure und 22,5 ml Toluol hinzu. Durch 15minütiges Schütteln wird das Vanillin in das Toluol extrahiert. Man zentrifugiert für 5 Min. in 35 ml Polyethylenzentrifugenröhrchen und überführt dann 20 ml der überstehenden Toluolphase in ein anderes Zentrifugenröhrchen, das bereits 5 ml 2 M Ammoniak enthält. Nach erneutem 15minütigem Schütteln werden die Phasen durch Zentrifugation getrennt und das Toluol mit Hilfe der Wasserstrahlpumpe und einer auf dem Vakuumschlauch aufgesteckten Polyethylen-Spitze vorsichtig bis zur Phasengrenze abgesaugt. Die Ammoniakphase stellt man mit 1,2 ml 10 M Essigsäure auf einen pH von 6.0 ein. Danach überschichtet man mit 18 ml Toluol. Nach erneuter Zentrifugation werden 15 ml der Toluolphase in ein Szintillationsröhrchen überführt, das 0,6 ml Liquifluor enthält und die Radioaktivität der Proben im Flüssigkeits-Szintillationszähler gemessen. Zur Erniedrigung des Quench-Effektes kühlt man dabei auf 8°C. Bei einer Zähldauer von 100 Min./Probe ergibt sich ein durchschnittlicher prozentualer Zählfehler von 0,7 - 1,0% im Tritium-Kanal.

5.3.1.4 Chromatographiebedingungen für die
säulenchromatographische Isolierung
der COMT

Säule:	DE 32-TÄÄ	0,05 M	pH 8.8
Durchmesser:	39 mm		
Temperatur:	1°C		
Länge:	29 cm		
Gelbett:	19 cm		
Schreibervor- schub:	1 cm/h		
Durchsatz:	20 ml/h		
Elutionsmittel:	zunächst (Auftrag) TÄÄ 0,05 M		
Gradient:	0,01 M - 0,2 M Sörensen-PO ₄		
	pH 6.5/16 h/30 Min.	Fructose	
Proteingehalt:	27,93 mg/ml		
Auftrag:	181,5 mg		
Gradient:	0,01 M	0,2 M PO ₄	16 h
Step:	0,5 M PO ₄		

5.3.1.5 Präparative Darstellung von 3-H-Meta-
neph rin bzw. 3-H-Normetaneph rin

Die Umsetzung stellt ein Vielfaches des Ansatzes wie unter Kap. 5.3.1, S. 225 beschrieben dar. Anstelle von Plasma bzw. Standardlösungen wird 1 ml einer Adrenalin- oder Noradrenalinlösung mit einer Konzentration von 1 mg/ml eingesetzt.

Der Reaktionsstop erfolgt mit 2,5 ml 1 M Boratpuffer (pH 11.0). Unter Zugabe von 200 µl Metanephrin (Normetanephrin)-Lösung als "Carrier" extrahiert man 3mal mit je 20 ml Toluol/Isoamylalkohol-Gemisch. Die vereinigten Extrakte werden am Rotationsverdampfer eingengt und in 500 µl 94%igem Ethanol wieder aufgenommen. Für die Dünnschichtchromatographie wird der Rückstand als 10 cm langes Band auf Kieselgel G Platten aufgetragen. Man spült den Kolben mit 500 µl 94%igem Ethanol nach und trägt wiederum auf. Die Chromatographiebedingungen sind wie unter Kap. 5.3.2, S. 231 angegeben.

Nach dem Abschaben eluiert man das Kieselgel 2mal mit je 10 ml 94%igem Ethanol, dampft die vereinigten Eluate zur Trockene ein und nimmt wiederum in 500 µl 94%igem Ethanol auf. Zur Bestimmung der Aktivität werden 20 µl der Präparation mit 10 ml Bray's Solution versetzt und im Szintillationszähler gemessen. Für Metanephrin haben wir 37.000 cpm, für Normetanephrin 55.650 cpm erhalten.

5.3.2 Die fraktionierte quantitative Bestimmung von Adrenalin und Noradrenalin

5.3.2.1 Geräte, Chemikalien und Lösungen

wie bei Kap. 5.3.1, dazu:

Geräte:

Dünnschicht-Applikator (ICN)

Sprühdosen für die DC (SERVA International)

Chemikalien:

DC-Platten Kieselgel 60 G (20 x 20 cm) (MERCK)

Lösungen:

Referenzlösung:

Je 1 mg Metanephrin und Normetanephrin/ml

Ethanol

Fließmittel:

Essigsäureethylester/Methanol/Ameisensäure
(60/35/5)

Sprühreagenz nach SIGGERS et al. (1970):

10 ml para-Nitroanilin-Lösung (1,5 g gelöst in
45 ml konz. Salzsäure, auf einen Liter mit
dest. Wasser aufgefüllt) mit 0,2 ml 10%iger
Natriumnitritlösung. Kurz vor Gebrauch gibt
man noch 10 ml 10%ige Natriumcarbonatlösung
hinzu.

4 M Ammoniak

5.3.2.2 Probennahme und Probenlagerung

vgl. Kap. 5.3.1, S. 224

5.3.2.3 Arbeitsvorschrift

Für die getrennte Bestimmung der Catecholamine werden von uns 200 µl Plasma pro Inkubationsansatz eingesetzt. Die weitere Aufarbeitung der Proben bis einschließlich der Einengung am Rotationsverdampfer erfolgt wie unter 5.3.1, S. 225 beschrieben. Dann wird nach Abdampfen des Toluol/Isoamylalkohol-Gemisches der Rückstand zunächst mit 150 µl, dann mehrmals mit 250 µl Ethanol/l aufgenommen. Die Eluate, maximal 1.000 µl, werden mit einem Dünnschicht-Applikator auf DC-Platten mit Kieselgel G bandförmig (5-6 cm lang) aufgetragen.

Der Start liegt 2 cm vom unteren Plattenrand entfernt. Jede Platte (20 x 20 cm) reicht für zwei Bänder aus. Dazwischen trägt man die Metanephrin- und Normetanephrin-Referenzstandards auf (1mg/ml Ethanol).

Die Trennung erfolgt bei Kammersättigung mit aufsteigender Chromatographie. Als mobile Phase dient Essigsäureethylester/Methanol/Ameisensäure (60/35/5). In zwei Läufen wird über die gesamte Laufstrecke chromatographiert.

Zwischen den Entwicklungen wird die Platte getrocknet. Die Laufzeit beträgt insgesamt ca. 2 Stunden. Während man die Banden mit den Untersuchungslösungen abdeckt, läßt man die Laufstrecken frei, auf denen die "Referenzspots" liegen. Als Sprühreagenz wird para-Nitroaniliniumdiazoniumchlorid verwendet (SIGGERS et al. 1970). Nach dem Besprühen erscheint das Meta- bzw. Normetanephrin orange-farben.

Die dem Meta- bzw. dem Normetanephrin zugehörigen Banden werden so lokalisiert und in Zentrifugenröhrchen abgeschabt. Das Kieselgel pulverisiert man sorgfältig und eluiert es dann mit 2,5 ml 4 M Ammoniak. Man hebt 2 ml des Eluates ab, gibt 2,5 ml Wasser hinzu und eluiert erneut. 2,5 ml dieses Eluates werden mit dem ersten Eluat vereinigt und in 45 ml fassende Zentrifugengläser überführt. Nach Hinzugabe von 500 µl 3%iger Natriumperjodatlösung inkubiert man 10 Min. bei 37°C. Der Reaktionsstop erfolgt mit 1 ml 10 M Essigsäure. Alle weiteren Reaktionsschritte entsprechen den Angaben unter Kap. 5.3.1, S. 225.

5.3.3 Die Bestimmung der Gesamt-Catecholamine
im Plasma nach COYLE u. HENRY (1973)

5.3.3.1 Geräte, Chemikalien und Lösungen

Geräte:

vgl. Kap. 5.3.1, S. 219

Chemikalien:

Alle nicht aufgeführten Chemikalien sind von
der Firma MERCK in p.A.- Qualität

3-H-SAM (N.E.N.)

Metanephrin-, Normetanephrin-Hydrochlorid
(Fa. SIGMA)

Adrenalin, Noradrenalin (FLUKA)

Lösungen:

3-H-SAM; COMT-Präparation.

Carrier; wie bei 5.3.1 beschrieben.

Essigester/Methanol-Gemisch: Man mischt

Essigester mit Methanol (10:1, v/v) und
sättigt mit Wasser.

Mercaptoethanol-Gemisch:

21,2 g Tris werden in ca. 60 ml Wasser gelöst
und auf pH 8.25 eingestellt. Dann gibt man
1.020 mg $\text{MnCl}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ und 500 mg Dithioerythrit
zu und füllt mit Wasser auf 100 ml auf.

5.3.3.2 Probennahme und Probenlagerung

vgl. Kap. 5.3.1, S. 224

5.3.3.3 Arbeitsvorschrift

1 ml Plasma wird mit 20 μ l 70%iger Perchlorsäure versetzt und am Rührmixer gründlich gemischt. Man zentrifugiert bei -4°C und hebt den klaren Überstand ab.

300 μ l dieses Überstandes werden mit 100 μ l des Mercaptoethanol-Gemisches und mit 100 μ l der 3-H-SAM-Lösung versetzt. Dann gibt man in einer Zeitreaktion 25 μ l der COMT-Präparation bei. Die Blanks werden ohne Zusatz von Enzympräparation hergestellt.

Es wird 60 Min. lang bei 37°C inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 200 μ l 1 M Boratpuffer (pH 11.0) abgestoppt. Man gibt 20 μ l Carrier-Lösung zu und überschichtet mit 10 ml des Essigester/Methanol-Gemisches. Nach 10 Min. Extraktion wird zentrifugiert und 8 ml der organischen Phase in ein anderes Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Zugabe von 500 μ l 0,5 M Boratpuffer (pH 10.0) erfolgt eine erneute Extraktion und Zentrifugation. 7 ml der überstehenden Phase werden abgehoben und mit 500 μ l 0,1 M Salzsäure unterschichtet.

Nach Extraktion und Zentrifugation saugt man mit einer Wasserstrahlpumpe die organische Phase ab und verwirft diese. Die zurückbleibende wässrige Phase wird nochmals mit 8 ml wassergesättigtem Essigester nachgewaschen.

Die Röhrchen werden nun in ein Eisbad gestellt. In einer Zeitreaktion gibt man zur Ausführung der Vanillinoxidation 50 μ l einer 3%igen Natriumperjodatlösung zu und 2 Min. später 50 μ l einer 10%igen Glycerinlösung (v/v). Das Gemisch wird dann mit 10 ml Toluol extrahiert und zentrifugiert. Von der oberen Toluol-Phase überführt man 9 ml in ein Röhrchen, das bereits 1 ml 1 M Natronlauge enthält. Nach Extraktion und Zentrifugation saugt man die obere Phase ab und verwirft diese. Der Rückstand wird mit 100 μ l Eisessig und 10 ml Toluol versetzt. Nach erneuter Extraktion und Zentrifugation hebt man 9 ml der Toluol-Phase in ein Szintillationsröhrchen ab, in dem bereits 400 μ l Liquifluor vorliegen. Die Radioaktivität der Proben wird am Flüssigkeits-szintillationszähler gemessen.

5.3.4 . Die quantitative Bestimmung von Noradrenalin im Plasma

5.3.4.1 Geräte, Chemikalien und Lösungen

Geräte:

Kühlzentrifuge Minifuge [®] 2 (HERAEUS-CHRIST)
Vortex-Mixer (WILTEN & Co.)
Schüttelmaschine LSS/1 (GERHARDT)
Flüssigkeits-Szintillationszähler LS-230
(BECKMAN)
Polyethylen-Zählfläschchen 23 ml (ZINSSER)
Digital pH Meter (BECKMAN)
Schüttelwasserbad (KÖTTERMANN)
Plastik-Einmalartikel aus Polypropylen

Chemikalien:

L-Glutathion, reduziert (SERVA)
S-Adenosyl-L-Methionin, Methyl-3H (3-H-SAM);
Spez. Akt. 48 Ci/mM (N.E.N.)
EDTA (Titriplex III, Dinatriumsalz) p.A.
(MERCK)
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-hydrochlorid
(SERVA)
Dithiothreitol (SIGMA)
PNMT-Enzymlösung, Herstellung nach HENRY et al.
(1975), Säulenchromatographie nach MOLINOFF et
al. (1971).
 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ p.A. (MERCK)
DL-(7-¹⁴C Adrenalin-Tartrat); Spez. Akt.
59,4 mCi/mM (CIS)

Aluminiumoxid neutral (MERCK), aktiviert
nach ANTON u. SAYRE (1962)
L-Adrenalin (SERVA)
Arterenol [®] (L-Noradrenalin), 1 mg/ml (HOECHST)
Perchlorsäure 70% p.A. (MERCK)
S-Adenosyl-L-Methionin-Hydrochlorid (SAM·HCl)
(SIGMA)
Essigsäure 100% p.A. (MERCK)
Phosphorwolframsäure (SIGMA)
Di-(2-Ethylhexyl)-Phosphorsäure (DEHP) (SIGMA)
Toluol p.A. (MERCK)
 KH_2PO_4 p.A. (MERCK)
 K_2HPO_4 p.A. (MERCK)
Liquifluor (N.E.N.)

Zum Ansetzen der Lösungen und während des
Analysenganges wird nur Aqua bidest. verwendet.

Lösungen:

Reaktionsgemisch:

90 μl 3-H-SAM + 810 μl Tris-Puffer

Tris-Puffer:

5 g EDTA (Titriplex III, Dinatriumsalz) und
1,54 mg Dithiothreitol werden mit 1 M
Tris · HCl, pH 8.6, auf 100 ml aufgefüllt.

0,5 M Natriumphosphatpuffer pH 10.0

Für 200 ml Puffer werden in ein 250 ml Becherglas eingewogen:

3,086 mg Dithriothreitol

10,0 g EDTA (Titriplex III, Dinatriumsalz)

14,196 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Man gibt ca. 150 ml Wasser hinzu und rührt so lange, bis alle Substanzen gelöst sind. Dann stellt man den pH-Wert mit konz. NaOH (ca. 10 ml 5 M) auf 10.0 ein füllt schließlich zu 200 ml auf.

Interner Standard, 14-C-Adrenalin-Lösung

100 μl DL-Adrenalin 14-C-7-Tartrat (spez. Akt. 59,4 mCi/mM, 250 μCi in 500 μl Wasser) werden mit 5.150 μl 0,1 N Essigsäure und 9 mg Adrenalin so verdünnt, daß die spez. Akt. 1 mCi/ mM beträgt. Von dieser Lösung gibt man 100 μl zu 4 ml Wasser und verdünnt schließlich noch einmal 1:4.

0.1 M HClO_4

6 ml 70% HClO_4 werden mit Wasser auf 1 l aufgefüllt.

25 μg Adrenalin und 100 μg SAM · Cl in 50 μl

0,2 M Essigsäure

Man vermischt 200 μl SAM·Cl-Lösung mit 500 μl Adrenalin-Lösung und gibt 250 μl 0,4 M Essigsäure und 50 μl Wasser hinzu.

SAM·Cl-Lösung

10 mg SAM·Cl werden in 1 ml Wasser aufgelöst.
Die Lösung wird im Kühlschrank gelagert.

Adrenalin-Lösung

10 mg Adrenalin werden in 10 ml 0,2 M Essigsäure aufgelöst. Die Lösung wird alle 4 Wochen frisch hergestellt und im Kühlschrank gelagert.

Gesättigte Phosphor-Wolfram-Säure

2,5 g Phosphor-Wolfram-Säure werden mit Wasser auf 10 ml aufgefüllt.

DEHP/Toluol

10 ml Di-(2-Ethylhexyl)-Phosphorsäure werden mit Toluol auf 1 Liter aufgefüllt.

1 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7.15

Zu 100 ml einer Lösung von 13,609 g KH_2PO_4 /100 ml H_2O werden 180 ml einer Lösung von 17,4 g K_2HPO_4 /100 ml H_2O gegeben.

5.3.4.2 Probennahme und Probenlagerung

vgl. Kap. 5.3.1, S. 224

5.3.4.3 Arbeitsvorschrift

In transparente Spitzenzentrifugenröhrchen von ca. 10 ml Nutzvolumen werden im Eisbad 100 μ l Plasma einpipettiert. Dazu gibt man 50 μ l des frisch hergestellten Reaktionsgemisches. Gestartet wird die Zeitreaktion durch Addition der PNMT-Enzymmischung. Die benötigte Menge richtet sich nach der jeweiligen Aktivität der Enzympräparation und ist in Vorversuchen zu bestimmen. In den meisten Fällen werden zwischen 20 und 50 μ l eingesetzt. Bei den Blank-Werten ist die Enzymreaktion sofort abzustoppen. Dazu versetzt man die jeweiligen Röhrchen vor der Inkubation mit 2 ml 0,5 M Natrium-Phosphat-Puffer (pH 10.0). Proben sowie Blanks werden im Schüttelwasserbad für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Der Reaktionsstop der Proben erfolgt dann ebenfalls durch die Zugabe von 2 ml 0,5 M Natrium-Phosphat-Puffer (pH 10.0). Anschließend pipettiert man zu jedem Ansatz 50 μ l der wässrigen 14-C-Adrenalinlösung, ca. 600 - 1.000 cpm, als interner Standard für die individuelle Ermittlung der Wiederauffindungsrate.

Zur Abtrennung des Adrenalins aus dem Reaktionsgemisch wird es an 150 mg vorbehandeltem Aluminiumoxid adsorbiert. Man schüttelt diese

Proben 3mal je 3-5 sec. am Vortex-Mischer. Nachdem man zentrifugiert hat, saugt man die überstehende Flüssigkeit möglichst vollständig ab und verwirft sie. Das Aluminiumoxid wird 3mal durch kurzzeitiges "Vortex-Mixen" mit je 3-5 ml Wasser nachgewaschen. Nach dem letzten Waschgang wird kurz zentrifugiert und der Überstand wiederum entfernt.

Die Elution des 3-H-Adrenalins vom Aluminiumoxid wird mit 1 ml kalter 0,1 M Perchlorsäure unter erneutem Mischen durchgeführt. Anschließend werden 50 µl einer frisch angesetzten 0,2 M Essigsäurelösung zupipettiert, die 25 µg Adrenalin und 100 µg SAM-Cl enthält. Nach Zugabe von 100 µl einer gesättigten Phosphor-Wolfram-Säurelösung stellt man die Zentrifugengläser 5 Min. lang in ein Eisbad und zentrifugiert dann 5 Min. bei niedriger Geschwindigkeit. 1 ml des Überstandes wird in 25 ml-Zentrifugengläser überführt, die bereits 10 ml DEHP-Toluol und 1 ml 1,0 M Kaliumphosphatpuffer pH 7.15 enthalten. Man extrahiert 15 Min. durch kräftiges Schütteln und zentrifugiert dann 10 Min. bei niedriger Geschwindigkeit, um die Phasen voneinander zu trennen. 9 ml der klaren organischen Phase werden in Szintillationsgläsern mit 400 µl Liquifluor überführt. Die Radioaktivitätsmes-

sung erfolgt im Flüssigkeitsszintillationszähler. Zur quantitativen Auswertung wird entsprechend dem Verfahren bei der Doppelisotopenverdünnungsanalyse zum einen das markierte 3-H-Adrenalin im Tritiumkanal gemessen. Zum anderen bestimmt man die Wiederauffindungsrate des zugesetzten 14-C-Adrenalins im 14-C-Kanal. Die Energiefenster im 14-C-Kanal sind so einzustellen, daß kein Tritium mitgezählt wird. Die im Tritiumkanal gemessenen cpm-Werte werden nach der prozentualen Wiederauffindungsrate korrigiert und dann der ebenfalls korrigierte Blank-Wert subtrahiert. Aus der so ermittelten cpm-Zahl kann mit Hilfe einer Eichkurve die Noradrenalin-Konzentration der Plasmaprobe bestimmt werden.

5.3.4.4 Erstellung von Eichkurven

Zur Erstellung von Eichkurven werden zu Normalplasma 0; 200; 500; 1.000; 1.500; 2.000 und 3.000 pg NA/ml Plasma addiert. Als Noradrenalin-Stammlösung verwendet man eine Arterenol®-Lösung, die 1 mg NA/ml Wasser enthält.

Definierte Mengen dieser Verdünnung werden zu 900 µl Plasma gemischt. Der Volumenausgleich wird mit 0,01 N Salzsäure vorgenommen,

so daß insgesamt 1.000 µl Eichplasma entstehen.
Die Aufarbeitung dieser Proben erfolgt wie
beschrieben.

5.3.5 Herstellung der Sprühreagenzien für Dünnschichtplatten

- a) Methanolische Kaliumhydroxidlösung:
Ein Gemisch aus 10 g Kaliumhydroxid,
45 ml Methanol und 45 ml Aqua dest.
Diese Lösung ist nur begrenzt haltbar.
- b) Jodlösung:
0,3 g Jod werden zu 100 ml wässriger
Kaliumjodidlösung gegeben.
- c) Kaliumpermanganat-Schwefelsäurelösung:
0,5 g Kaliumpermanganat werden in 15 ml
konz. Schwefelsäure gelöst.
- d) para-Nitroanilin -diazonium-chlorid:
Man mischt 10 ml para-Nitroanilin-
Lösung (1,5 g der Substanz werden in
45 ml konz. Salzsäure gelöst und auf 1 l
mit dest. Wasser aufgefüllt) mit 0,2 ml
einer 10%igen Natriummitritlösung und
gibt kurz vor Gebrauch 10 ml einer 10%igen
Natriumcarbonatlösung zu.

5.4 Versuchsbeschreibungen zur hochdruck-
flüssigkeitschromatographischen Be-
stimmung von Catecholaminen und
einiger ihrer Metaboliten im Urin

5.4.1 Die quantitative Bestimmung von
Vanillinmandelsäure, Homovanillin-
säure und Vanillinsäure im Urin

5.4.1.1 Geräte und Chemikalien

Geräte:

Schüttelmaschine (GERHARDT)

Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatograph:

Micromeritics Modell 7000 (COULTER-ELECTRONICS)

Einspritzventil mit 100 µl Probenschleife
(REODYNE)

Säule: Edelstahl; Länge 250 mm,
 Innendurchmesser 4,6 mm

Säulenfüllmaterial:

Nucleosil C₁₈, 10 µm

(MACHEREY-NAGEL & Co.)

(Trennsäulen gefüllt nach der
Viskositätsmethode mit i-Propanol
mit Säulenpacker Modell 705 von
Micromeritics)

Detektor: SCHOEFFEL Spektralphotometer
 SF 770
Integrator: 3380 A (HEWLETT-PACKARD)

Chemikalien:

Vanillinmandelsäure, Homovanillinsäure,
Vanillinsäure (SIGMA)
Alle übrigen Chemikalien sind von der Firma
MERCK in p.A.-Qualität.

5.4.1.2 Probenlagerung

100 ml Urin werden sofort mit 1 ml konz.
Essigsäure versetzt und bei -20°C
tiefgefroren.

5.4.1.3 Arbeitsvorschrift

Zu 10 ml der Urinprobe gibt man 10 ml Wasser
und 100 ml 37%ige Salzsäure. Dann versetzt man
die Lösung mit Kochsalz bis zur Sättigung.
Nun wird 2mal 10 Minuten lang mit je 200 ml
Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten
organischen Phasen versetzt man mit 1,5 ml
1 M Kaliumcarbonatlösung, schüttelt 5 Min. und
zentrifugiert. Dann wird die organische Phase
abgesaugt und verworfen. Die übrigbleibende
wässrige Phase wird mit 700 µl 37%iger Salz-
säure angesäuert. Von dieser Lösung werden 5 bis
50 µl in den HPLC injiziert.

Hochdruckflüssigkeitschromatographische
Arbeitsbedingungen für die VMA-Bestimmung:

Wellenlänge: 204 bzw. 275 nm
Säulentemperatur: Raumtemperatur
Druck: 140 bar
Durchfluß: 2 ml/Minute
mobile Phase: 1 M Na_2SO_4 in 0,001 M KH_2PO_4 ;
pH 3.5

Hochdruckflüssigkeitschromatographische
Arbeitsbedingungen für die HVA- und VA-Bestimmung:

Wellenlänge: 204 nm
Säulentemperatur: Raumtemperatur
Druck: 275 bar
Durchfluß: 1 ml/Minute
mobile Phase: Methanol/Phosphatpuffer/Wasser
(1/1/2)
Phosphatpuffer: 1 M Na_2SO_4 , 0,1 M KH_2PO_4
mit H_3PO_4 auf pH 2.1

5.4.1.4 Eichung

Die Eichung erfolgt auf der Basis von Urin-verdünnungsreihen. Je 10 mg VMA, HVA und VA werden in 10 ml Wasser gelöst. Aus dieser Stammlösung werden mit Poolurin Verdünnungen hergestellt, so daß man 0; 1; 2,5; 5; 7,5 und 10 mg VMA, HVA, VA/1 Urin addiert hat.

5.4.2 Die quantitative Bestimmung von Nor-adrenalin, Adrenalin, Dopamin und Dopa im Urin

5.4.2.1 Geräte und Chemikalien

Geräte:

Schüttelmaschine (GERHARDT)

Rührmixer (VORTEX)

Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatograph:

Micromeritics Modell 7000 (COULTER ELECTRONICS)

Einspritzventil (REODYNE)

Integrator 3380 A (HEWLETT-PACKARD)

Säule: Edelstahl, Länge 250 mm, Innendurchmesser 4,6 mm

Säulenfüllmaterial:

Nucleosil C₁₈, 5 µm

(MACHEREY, NAGEL & Co.)

Trennsäulen gefüllt nach der Viskositäts-
methode mit i-Propanol mit Säulenpacker Modell
605 von Micromeritics)

Detektor: Spektralfluorimeter SFM 22
(KONTRON)

Chemikalien:

Adrenalin, Noradrenalin, Dopamin, Dopa (SIGMA)
Aluminiumoxid: Al_2O_3 (WOELM) aktiviert nach
ANTON u. SAYRE (1962) geschlossen
aufbewahrt bei $+40^\circ\text{C}$, von Zeit zu
Zeit bei 220°C ausgeheizt.

Alle übrigen Chemikalien sind von der Firma
MERCK in p.A.-Qualität.

5.4.2.2 Probenlagerung

vgl. Kap. 5.4.1, S. 245

5.4.2.3 Arbeitsvorschrift

Zu 1 g aktiviertem Aluminiumoxid werden 10 ml
der Urinprobe, 4 ml einer 0,13 M Äthyl-
endiamintetraessigsäure-di-Natriumsalz (Titri-
plex III)-Lösung und 200 μl 3,1 mM Phenol-
phthalein-Lösung in Äthanol gegeben. Dann
tropft man aus einer Pasteur-Pipette 2 M Natron-

lauge vorsichtig zu, bis ein deutlicher Umschlag zur Rotfärbung (pH 8.4) aufgetreten ist. Jedes Röhrchen wird dann mit 28,1 mM Dinatriumhydrogenphosphatlösung, pH 8.4, auf ein Gesamtvolumen von 20 ml aufgefüllt. Dieser Ansatz wird 5 Min. geschüttelt. Dann läßt man das Aluminiumoxid absetzen und saugt den wässerigen Überstand ab. Das Sediment wird zum Nachwaschen mit 10 ml der Phosphatlösung versetzt und wiederum 5 Min. geschüttelt. Nach Absetzen des Aluminiumoxids wird der Überstand abgesaugt und verworfen. Die Elution der Catecholamine vom Aluminiumoxid erfolgt durch Zugabe von 1 ml 1 M Perchlorsäure. Nach 1minütigem Mischen am Rührmixer läßt man das Aluminiumoxid absetzen, hebt den Überstand an und zentrifugiert diesen gründlich. 100 µl der Perchlorsäurelösung werden in den Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographen injiziert.

Hochdruckflüssigkeitschromatographische
Arbeitsbedingungen:

Wellenlänge:	Anregung 275 nm, Emission 317 nm
Säulentemperatur:	Raumtemperatur
Druck:	150 bar
Durchfluß:	1 ml/Min.
mobile Phase:	0,2 M Ameisensäure

5.4.2.4 Eichung

Je 25 mg Adrenalin, Noradrenalin, Dopa und zusätzlich 125 mg Dopamin werden in 25 ml 0,01 Salzsäure gelöst und aus dieser Stammlösung mit Poolurin Verdünnungen hergestellt, so daß man 0; 10; 25; 50; 75; 100 µg A, NA, Dopa/l Urin bzw. 0; 50; 125; 250; 375; 500 µg Dopamin/l Urin addiert hat.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- AMELUNXEN, J. : J. Biochem. 193, 265
(1951)
- ANTON, A.H. : J. Pharmacol. Exp.
SAYRE, D.F. Ther. 138, 360 (1962)
- ARNOLD, E.L. : Anal. Chem. 45, 85
FORD, R. (1973)
- AXELROD, J. : J. Biol. Chem. 233,
SENOH, S. 697 (1958)
WITKOP, B.
- AXELROD, J. : Science 150, 892
DALY, J. (1965)
- AXELROD, J. : J. Pharmacol. Exp.
COHN, C.K. Therap. 176, 650 (1971)
- BALL, P. : Eur. J. Biochem. 26,
KNUPPEN, R. 560 (1972)
HAUPT, M.
BREUER, H.
- BEN-JONATHAN, N. : Endocrinology 98, 1497
PORTER, J. C. (1976)
- BERTANI, L.M. : Clin. Chim. Acta 30,
DZIEDZIC, S.W. 227 (1970)
CLARKE, C.
GITLOW, E.

- BLASCHKO, E. : Biochem. Pharmacol.
HERTTING, G. 20, 1363 (1971)
- BORCHARDT, R.T. : Anal. Biochem. 58,
382 (1974)
- BREWSTER, M.A. : Clin. Chem. 23, 2247
BERRY, D.H. (1977)
MORIARTY, M.
- BROCHMANN-HANSSEN, E. : J. Pharm. Sci. 51,
SVENDSEN, A.B. 938 (1962)
- BROEKEMA, R. : Recueil des Travaux
van der WERF, S. Chimiques des Pays-
ARENS, J.F. Bas 77, 258 (1958)
- BROOKS, C.J.W. : Anal. Chem. 36,
HORNING, E.C. 1540 (1964)
- BÜHLER, H. U. : J. Physiol. 276, 311
Da PRADA, M. (1978)
HAEFELY, W.
PICOTTI, G.B.
- BUSSEMAS, H.H. : J. Clin. Chem. Clin.
LIPPMANN, C. Biochem. 15, 367
SCHWEDT, G. (1977)
- CAMPUZANO, H.C. : Anal. Biochem. 64,
WILKERSON, J.E. 578 (1975)
HORVATH, S.M.
- CANCALON, P. : J. Chrom. Sci. 10,
KLINGMAN, J.D. 253 (1972)

- CANNON, W.B. : Amer. J. Physiol. 58
URIDIL, J.Z. 353 (1921/22)
- CAPELLA, P. : Anal. Chem. 38,
HORNING, E.C. 316 (1966)
- CHRISTENSEN, N.J. : J. Clin. Invest. 51,
779 (1972)
- : Clin. Sci. Mol. Med.
45, 163 (1973a)
- : J. Clin. Lab. Invest.
31, 343 (1973b)
- CLARKE, D.D. : J. of Gas Chromato-
WILK, S. graphy 2, 307 (1967)
- GITLOW, S.E.
FRANKLIN, M.J.
- COMOY, E. : Clin. Chim. Acta 30,
BOHUON, C. 191 (1970)
- COYLE, J.T. : J. Neurochem. 21,
HENRY, D. 61 (1973)
- CREVELING, C.R. : Molec. Pharmacol. 8,
MORRIS, N. 398 (1972)
- SHIMIZU, H.
ONG, H.
DALY, J.
- CRYER, P.E. : Clin. Res. 22, 465 A
SANTIAGO, S. (1974)

- CRYER, P.E. : J. Clin. Endocrinol.
SANTIAGO, S. Metab. 39, 1025 (1974)
SHAH, S.
- Da PRADA, M. : Life Sci. 19, 1161
ZÜRCHER, G. (1976)
- DAVIS, T.P. : Clin. Chem. 24, 1317
GEHRKE, C.W. (1978)
GEHRKE, C.W. jr.
CUNNINGHAM, T.D.
KUO, K.C.
GERHARDT, K.O.
JOHNSON, H.D.
WILLIAMS, C.H.
- De CHAMPLAIN, J. : Circ. Res. 38, 109
FARLEY, L. (1976)
- De SCHAEFDRIYVER, A.F. : Clin. Chim. Acta 84,
MOERMAN, E.J. 321 (1978)
- DIAMANT, J. : J. Lab. Clin. Med. 85,
BYERS, S.O. 678 (1975)
- DIRSCHERL, W. : Hoppe-Seylers Zeit-
WIRTZFELD, A. schrift f. physiol.
Chemie 336, 81 (1964)
- DIXON, P.F. : High Pressure Liquid
GRAY, C.H. Chromatography in
LIM, C.K. Clinical Chemistry
STOLL, M.S. Academic Press London-
New York - San Francisco
1976

- DZIEDZIC, S.W. : Anal. Biochem. 47,
BERTANI, L.M. 592 (1972)
CLARKE, D.D.
GITLOW, S.E.
- EHRLÉN, I. : Farmaceutisk Revy 47,
320 (1948)
- ENDEL, D. : Z. klin. Chem. klin.
HOLLMANN, G. Biochem. 8, 77 (1970)
- ENGELMAN, K. : Amer. J. Med. Sci.
PORTNOY, B. 235, 259 (1968)
LOVENBERG, W.
- ENGELMAN, K. : Circ. Res. 26, 53
PORTNOY, B. (1970)
- ERIKSSON, B.-M. : Acta Pharm. Suec. 14,
ANDERSSON, I. 451 (1977)
BORG, K.O.
PERSSON, B.-A.
- EULER, von U.S. : Acta Physiol. Scand.
FLODING, J. 33, 57 (1955)
- FELICE, L.J. : Clin. Chim. Acta 76,
KISSINGER, P.T. 317 (1977)
- FENN, R.J. : Anal. Chem. 50, 1067
SIGGIA, S. (1978)
CURRAN, D.J.
- FLOHE, L. : Biochem. Biophys. Acta
SCHWABE, K. 220, 469 (1970)

- FLOOD, J.G. : Clin. Chem. 25, 1234
GRANGER, M. (1979)
McCOMB, R.B.
- FRERE, J.M. : Biochem. Biophys. Acta
VERLY, W.G. 235, 73 (1971)
- FRIEDMAN, M. : Metabolism 24, 205
BYERS, S.O. (1975)
DIAMANT, J.
ROSENMAN, R.H.
- GOODWIN, B.L. : Clin. Chim. Acta 44,
RUTHVEN, C.R.J. 271 (1973)
SANDLER, M.
HINE, B.
- GOSSLER, K. : Z. klin. Chem. klin.
SCHALLER, K.H. Biochem. 13, 249 (1975)
- GOSSLER, K. : Die Bedeutung der Hoch-
SCHALLER, K.H. druck-Flüssigkeits-
SCHIELE, R. Chromatographie in der
VALENTIN, H. Analyse von biologischem
Material.
Broschüre der Spectra-
Physics GmbH, Darmstadt
(1977)
- GOSSLER, K. : Methoden zur Trennung
SCHALLER, K.H. und quantitativen Be-
stimmung von Catecholaminen
und deren Metaboliten aus
Urinproben.
Symposiumsband zu den
Königsteiner-Chromato-
graphie-Tagen, S. 133
(1978a)

- GOSSLER, K. : Int. Arch. Environ.
SCHIELE, R. Hlth. 41, 103 (1978b)
SCHALLER, K.H.
WELTLE, D.
MÜLLER, S.
VALENTIN, H.
- GRANOT, J. : Fed. of Europ. Biochem.
Soc. 67, 271 (1976)
- GRIFFITHS, J.C. : Clin. Chim. Acta 30,
LEUNG, F.Y.T. 395 (1970)
McDONALD, T.J.
- GRIFFITHS, J.C. : Clin. Chim. Acta 39,
LINKLATER, H. 383 (1972)
- HAEFFNER, L.J. : J. Chrom. 118, 425
MAGEN, J.S. (1976)
KOWLESSAR, O.D.
- HÄGGENDAL, J. : Acta physiol. scand.
59, 242 (1963)
- HALLMAN, H. : Life Sci. 23, 1049
FARNEBO, L.-O. (1978)
HAMBERGER, B.
JONSSON, G.
- HANSSON, C. : J. Chrom. 162, 7
AGRUP, G. (1979)
RORSMAN, H.
ROSENGREN, A.-M.
ROSENGREN, E.

- HENRY, D.P. : Life Sci. 16, 375
STARMAN, B.J. (1975)
JOHNSON, D.G.
WILLIAMS, R.H.
- HOLTZ, P. : Naturwissenschaften
SCHÜMMANN, H.J. 35, 159 (1948)
- : Naunyn-Schmiedeberg's
Arch. Exp. Path. Pharmac.
206, 49 (1949)
- HORNING, M.G. : Analyt. Letters 1,
MOSS, A.M. 311 (1968)
BOUCHER, E.A.
HORNING, E.C.
- IMAI, K. : Chem. Pharm. Bull. 17,
TAMURA, Z. 1076 (1969)
- IMAI, K. : Chem. Pharm. Bull.
SUGIURA, M. (Tokyo) 19, 409 (1971)
TAMURA, Z.
- IMAI, K. : Clin. Chim. Acta 43,
WANG, M.-T. 145 (1973)
YOSHIE, S.
TAMURA, Z.
- IMAI, K. : Clin. Chim. Acta 85,
TAMURA, Z. 1 (1978)
- JACOB, K. : J. Chrom. 146, 221
VOGT, W. (1978)
KNEDEL, M.
SCHWERTFEGER, G.

- JIANG, N.-S. : Mayo Clin. Proc. 48,
STOFFER, S.S. 47 (1973)
PIKLER, G.M.
WADEL, O.P.
SHEPS, N.G.
- JIANG, N.-S. : Mayo Clin. Proc. 51,
MACHACEK, D. 112 (1976)
WADEL, O.P.
- JOHNSON, G.A. : Current Therapeutic
PEULER, J.D. Res. 21, 898 (1977)
BAKER, C.A.
- KÄGI, J. : Arch. exp. Path.
BURGER, M. Pharmacol. 230, 470
GIGER, K. (1957)
- KAHANE, Z. : J. Lab. Clin. Med. 70,
VESTERGAARD, P. 333 (1967)
- KAHANE, Z. : Clin. Chim. Acta 35,
VESTERGAARD, P. 49 (1971)
- KAROUM, F. : Anal. Biochem. 47,
CATTABENI, F. 550 (1972)
COSTA, E.
- KAWAI, S. : Chem. Pharm. Bull. 16,
TAMURA, S. 699 (1968a)
- : Chem. Pharm. Bull. 16,
1091 (1968b)

- KISSINGER, P.T. : Biochem. Med. 13, 299
RIGGIN, R.M. (1975)
ALCORN, R.L.
- KNOX, J.H. : J. Chrom. 125, 89
JURAND, J. (1976)
- KOSLOW, S.H. : Science 176, 177
CATTABENI, F. (1972)
COSTA, E.
- LOEWI, O. : Pflügers Arch. Ges.
Physiol. 189, 239
(1921)
- : Pflügers Arch. Ges.
Physiol. 237, 504
(1936)
- : Arch. Int. Pharma-
codyn. 57, 139 (1937)
- LOVELADY, H.G. : J. Chrom. 108, 43
FOSTER, L.L. (1975)
- LOVELADY, H.G. : Biochem. Med. 15, 138
(1976)
- LUND, A. : Acta phramacol. 5, 231
(1949)
- MARTIN, J.L. : Biochem. Pharmacol. 22,
ANSOLL, G.B. 521 (1973)

- MÄURER, W. : Verhandlungen Dt. Ges.
KÜBLER, W. Inn. Med. 80, 240
YOSHIDA, Y. (1974)
KUHN, H.
BREITHARDT, G.
- MARUYAMA, Y. : Anal. Biochem. 49, 240
TAKEMORI, A.E. (1972)
- MATUSSEK, N. : Privatmitteilungen
WELTER, D. (1980)
- McCULLOUGH, H. : J. clin. Path. 21,
759 (1968)
- McDONALD, T.J. : J. clin. Path. 26,
MURPHY, B.E.P. 37 (1973)
- MELL, L.D. : Clin. Chem. 23, 473
GUSTAFSON, A.B. (1977)
- MELL, L.D. : J. Liquid. Chromatogr. 1,
DASLER, A.R. 261 (1978a)
GUSTAFSON, A.B.
- MELL, L.D. jr. : Clin. Chem. 24, 1290
GUSTAFSON, A.B. (1978b)
- MERZHÄUSER, J. : Klin. Wschr. 51, 883
RÖDER, E. (1973)
HESSE, C.
- MESSIHA, F.S. : Clin. Chim. Acta 45,
BAKUTIS, E. 159 (1973)
FRANKOS, V.

- MITCHELL, J. : J. Chrom. 145, 295
COSCIA, C.J. (1978)
- MIURA, Y. : J. Lab. Clin. Med. 89,
CAMPESE, V. 421 (1977)
De QUATTRO, V.
MEIJER, D.
- MIZUNO, Y. : Clin. Chim. Acta 74,
11 (1977)
- MOFFAT, A.C. : Biochim. Biophys. Acta
HORNING, E.C. 222, 248 (1970)
- MOLINOFF, P.B. : J. Pharmacol. Exp.
WEINSHILBOUM, R. Ther. 178, 425 (1971)
AXELROD, J.
- MOYER, T.P. : Clin. Chem. 25, 256
JIANG, N.-S. (1979)
TYCE, G.M.
SHEPS, S.G.
- MÜLLER, T. : Diplomarbeit an der
Universität München
(1977)
- : Arzneimittelforschung
28, 1304 (1978)
- NARASIMHACHARI, N. : Anal. Biochem. 45,
VOUROS, P. 154 (1972)

- NENAD, B. : Clin. Chim. Acta 75,
ROSENMUND, H. 213 (1977)
- O'HANLON, J.F. : Anal. Biochem. 34,
568 (1970)
- PASSON, P.G. : Anal. Biochem. 51,
PEULER, J.D. 618 (1973)
- PEDERSEN, E.B. : Acta med. scand. 198,
CHRISTENSEN, N.J. 373 (1975)
- PEYRIN, L. : Anal. Biochem. 56,
COTTET-EMARD, J.M. 515 (1973)
- QUEK, E.S.C. : Clin. Chim. Acta 58,
BUTTERY, J.E. 137 (1975)
De WITT, G.F.
- RAWLINSON, W.A.L. : Br. J. Anaesth. 50,
LOACH, A.B. 937 (1978)
BENEDICT, C.R.
- RAYMOND, F.A. : Clin. Chim. Acta 58,
WEINSHILBOUM, R.M. 185 (1975)
- REFSHAUGE, C. : Life Sci. 14, 311
KISSINGER, P.T. (1974)
DREILING, R.
BLANK, L.
FREEMAN, R.
ADAMS, R.N.

- RENZINI, V. : Clin. Chim. Acta 30,
BRUNORI, C.A. 587 (1970)
VALORI, C.
- RIGGIN, R.M. : Clin. Chem. 22, 782
ALCORN, R.L. (1976)
KISSINGER, P.T.
- RIGGIN, R.M. : Anal. Chem. 49, 2109
KISSINGER, P.T. (1977)
- ROBINSON, R.L. : Microchem. J. 22, 514
(1977)
- ROHMERT, W. : Schriftenreihe Arbeits-
med., Sozialmed. Prä-
ventivmed. 51,
A.W. Gentner-Verlag,
Stuttgart (1973)
- ROIZEN, M.F. : Anaesthesiology 41, 432
MOSS, J. (1974)
HENRY, D.P.
KOPIN, I.J.
- ROSANO, T.G. : Clin. Chem. 25, 550
BROWN, H.H. (1979)
- RUTENFRANZ, J. : Arbeitsmedizinische Er-
wartungen an die Ergo-
nomie.
In: Verh. d. Dtsch. Ges.f.
Arbeitsmed. e.V. Bericht
über die 15. Jahrestagung
d. Dtsch. Ges. f. Arbeits-
med. e.V. München, 24.-
26. April 1975, S. 31
A.W. Gentner-Verlag, Stutt-
gart (1976)

- SAKAUCHI, N.
KUMAOKA, S.
HANAWA, Y.
- : Endocrinol. Japon. 19,
589 (1972)
- SANKOFF, I.
SOURKES, T.L.
- : Canadian J. Biochem.
Physiol. 41, 1381 (1963)
- SCHAEFER, H.
- : Stress als gesellschaft-
liches Problem.
In: Seelische und kör-
perliche Störungen
durch Stress.
(A.W. v. Eiff, Hrsg.)
S. 5 - 17
Gustav Fischer Verlag
Stuttgart - New York
(1976)
- SCHIELE, R.
GOSSLER, K.
SCHALLER, K.H.
- : Untersuchungen zum Verhalten
verschiedener beanspruchungs-
bezogener biologischer
Parameter unter definierten
physischen und psychischen
Belastungen.
Forschungsbericht Nr. 185
Wirtschaftsverlag NW GmbH
Bremerhaven (1978)
- SCHWARZ, S.
- : Wiener klin. Wschr. 89,
667 (1977)
- SCHWEDT, G.
- : Clin. Chim. Acta 51,
247 (1974)
- : Fresenius Z. Anal. Chem.
293, 40 (1978)
- SCHWEITZER, J.W.
FRIEDHOFF, A.J.
- : Life Sci. 8, 173
(1968)
- SELYE, H.
- : Acta med. Publ.
Montreal (1950)

- SHOUP, R.E. : Clin. Chem. 23, 1268
KISSINGER, P.T. (1977)
- SIGGERS, D.C. : Clin. Chim. Acta 30,
SALTER, C. 373 (1970)
TOSELAND, P.A.
- SMITH, E.R.B. : J. Lab. Clin. Med. 60,
WEIL-MALHERBE, H. 212 (1962)
- SOLE, M.J. : Biochem. Med. 18, 301
HUSSAIN, M.N. (1977)
- STERN, J.S. : J. Chrom. 30, 632
FRANKLIN, M.J. (1967)
MAYER, I.
- STROBACH, H. : Z. klin. Chem. klin.
Biochem. 5, 77 (1967)
- TAKAHASHI, S. : Clin. Chim. Acta 36,
GJESSING, L.R. 369 (1972)
- TURTON, M.B. : Clin. Chim. Acta 48,
DEEGAN, T. 347 (1973)
- UDENFRIEND, S. : Fluorescence Assay in
Biology and Medicine.
Academic Press, New
York (1964)

- UEDA, E. : Clin. Chim. Acta 80,
YOSHIDA, N. 447 (1977)
NISHIMURA, K.
JOH, T.
ANTOKU, S.
TSUKADA, K.
GANNON, S.
KOKUBU, T.
- VALENTIN, H. : Münch. Med. Wschr. 107,
LEHNERT, G. 1334 (1965)
MÜCKE, W.
DEUTZMANN, H.
- VALENTIN, H. : Materia Medica Nord-
LEHNERT, G. mark 21, 305 (1969)
- VALENTIN, H. : Schriftenreihe der
ESSING, H.-G. Bayer. Landesärztekammer 32, 196 (1973)
- VALENTIN, H. : Die Analyse des Stress
GOSSLER, K. aus arbeitsmedizinischer
SCHALLER, K.H. Sicht.
SCHÄCKE, G. Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Unfallforschung, Forschungsbericht Nr. 159
SCHIELE, R. Wirtschaftsverlag NW GmbH
WELTLE, D. Bremerhaven (1977)
- VIDEBAECK, J. : Circulation XLVI, 846
CHRISTENSEN, N.J. (1972)
STERNDORFF, B.
- VIKTORA, J.K. : Anal. Biochem. 23,
BAUKAL, A. 513 (1968)
WOLFF, F.W.

- WANG, M.-T. : Clin. Chim. Acta 63,
IMAI, K. 13 (1975)
YOSHIOKA, M.
TAMURA, Z.
- WEIL-MALHERBE, H. : Biochem. J. 51, 311
BONE, A.D. (1952)
- : Lancet 16, 974 (1953)
- : Biochem. J. 58, 132
(1954)
- : J. clin. Path. 10,
138 (1957)
- WEIL-MALHERBE, H. : Method in Medical
Research 9, 130 (1961)
- : Z. klin. Chem. 2, 161
(1964)
- WEISE, V.K. : Life Sci. 19, 1673
KOPIN, I.J. (1976)
- WERNER, U. : Z. klin. Chem. klin.
Biochem. 13, 341 (1975)
- WILLIAMS, C.M. : Clin. Chim. Acta 11,
GREER, M. 495 (1965)
- WISSER, H. : Z. klin. Chem. klin.
Biochem. 8, 637 (1970a)

- WISSER, H. : Z. klin. Chem. klin.
STAMM, D. Biochem. 8, 21 (1970b)
- WISSER, H. : Z. klin. Chem. klin.
KNOLL, E. Biochem. 11, 3 (1973)
- WISSER, H. : J. Clin. Chem. Clin.
BOSAK, J. Biochem. 17, 199 (1979)
KNOLL, E.
- WONG, K.P. : Clin. Chim. Acta 47,
RUTHVEN, C.R.J. 215 (1973)
SANDLER, M.
- WOOD, W.G. : Clin. Chim. Acta 61,
MAINWARING-BURTON, R.W. 297 (1975)
- YOSHIDA, A.
YOSHIOKA, M. : Clin. Chim. Acta 73,
YAMAZAKI, T. 315 (1976a)
SAKAI, T.
TAMURA, Z.
- YOSHIDA, A. : J. Chrom. 116, 240
YOSHIOKA, M. (1976b)
TANIMURA, T.
TAMURA, Z.

Lebenslauf

Klaus Ludwig Goßler, geb. am 24. Dez. 1944
in Forchheim/Ofr.

Eltern: Otto Goßler, Kaufmann
 Margarete Goßler, geb. Müller,
 Oberlehrerin

Volksschule: 1951 - 1955 in Forchheim/Ofr.
Oberrealschule: 1955 - 1965 in Forchheim/Ofr.

Studienbeginn: Wintersemester 1965/66 an der
 Friedrich-Alexander-Universität
 Erlangen-Nürnberg

Diplomchemiker-Vorprüfung: 27. Nov. 1968

Diplomchemiker-Hauptprüfung: Februar 1972

Diplomarbeit: Februar 1972 - Oktober 1973
 unter Leitung von Prof. Dr. G. Hesse
 am Institut für organische Chemie
 der Universität Erlangen-Nürnberg

Diplomzeugnis: 3. Dezember 1973

Dissertation: Seit Januar 1974 unter der
wissenschaftlichen Leitung
von Prof. Dr. G. Hesse

Ab 1. Febr. 1974 wissenschaftlicher Assistent
am Institut für Arbeits- und Sozialmedizin
und Poliklinik für Berufskrankheiten der Uni-
versität Erlangen-Nürnberg (Direktor: Prof. Dr.
H. Valentin).

Am 25. Mai 1978 Verleihung des Preises der
E.W. Baader-Stiftung

